



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **83466** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
G01N 33/48 (2006.01)
A61C 19/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 04008	(72) Винахідник(и): Петрушанко Тетяна Олексіївна (UA), Весніна Людмила Едуардівна (UA), Мамонтова Тетяна Василівна (UA), Іленко Наталія Володимирівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 01.04.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.09.2013	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.09.2013, Бюл.№ 17	(73) Власник(и): Петрушанко Тетяна Олексіївна, вул. Вільхова, 17, м. Полтава, 36000 (UA), Весніна Людмила Едуардівна, вул. Б. Хмельницького, 30, кв. 5, м. Полтава, 36000 (UA), Мамонтова Тетяна Василівна, вул. Освітнянська, 6, кв. 131, м. Полтава, 36021 (UA), Іленко Наталія Володимирівна, вул. Красіна, 114, корпус 2, кв. 105, м. Полтава, 36023 (UA)

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ЗАПАЛЬНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ТКАНИН ПАРОДОНТА У ВІЛ-ІНФІКОВАНИХ ЛЮДЕЙ**(57) Реферат:**

Спосіб діагностики запальних захворювань тканин пародонта у ВІЛ-інфікованих включає стандартизоване суб'єктивне та об'єктивне обстеження пацієнта, загальноприйняте клінічне обстеження порожнини рота, проведення індексної оцінки стану тканин пародонта, забір та лабораторне дослідження ротової рідини. Додатково у ротовій рідині визначають імунну відповідь за рівнем концентрації основних про- та протизапальних цитокінів - інтерлейкіну-10 (ІЛ-10) та фактора некрозу пухлин- α (ФНП- α), а також стресорне навантаження за рівнем концентрації кортизолу.

UA 83466 U

Запропонований спосіб належить до галузі медицини, а саме до стоматології, до терапевтичної стоматології.

Діагностика запальних захворювань тканин пародонта у ВІЛ-інфікованих людей є актуальною проблемою сучасної стоматології. Вона має як медичну, так і вагому соціальну значимість у зв'язку з високою частотою та інтенсивністю хвороб пародонта у ВІЛ-позитивних.

Проблема ВІЛ-інфекції набула глобального масштабу пандемії і продовжує розширювати свої межі. Інфікування вірусом імунодефіциту людини в 80-92 % супроводжується проявами в порожнині рота (Суржанський С.К. та ін., 2003). Часто оральні зміни є першими і маніфестними проявами ВІЛ-інфекції (Покровський В.В., 2000). Це пояснюється тим, що супутнє зниження імунітету сприяє розмноженню та поширенню умовно патогенної мікрофлори, що викликає характерне ураження тканин та органів ротової порожнини. При прогресуванні загального захворювання поширеність супутніх оральних проявів зростає. На фоні зниження імунітету відмічається як ріст захворюваності, тобто збільшення поширеності, інтенсивності клінічного перебігу стоматологічної патології, так і зростає схильність до рецидивів такої патології, відмічається складність у їх лікуванні та профілактиці (Шатохин А.І., 2008).

Клінічні прояви захворювань пародонта пов'язані з прогресуючим зниженням імунітету і відрізняються інтенсивною гіперемією ясен та появою некрозу ясен, що швидко розповсюджується на більшу частину ясеневого краю, швидко прогресуючою кістковою резорбцією, сильним іррадіюючим болем, спонтанними кровотечами з ясен. Проте на ранніх етапах захворювань пародонта та слизової оболонки у ВІЛ-позитивних пацієнтів характерна слабка вираженість суб'єктивних і об'єктивних ознак запалення (Суржанський С.К. Особенности стоматологического статуса у ВИЧ-позитивных пациентов / С.К.Суржанський, Е.К.Трофимець, Г.Ю.Агафонова, Воронина Л.А., А.В.Азаров, О.Ю.Воскресенская // Вісник стоматології.-2003. - № 3. - С. 15-17). Тому своєчасна і рання діагностика захворювань тканин пародонта у ВІЛ-інфікованих осіб є надзвичайно актуальною і необхідною для успішного лікування пацієнтів, є запорукою якнайдовшого збереження якості життя людей зі статусом ВІЛ.

Відомі різні способи діагностики запальних захворювань тканин пародонта у ВІЛ-інфікованих людей: Falasca K. Periodontitis and cytokine patterns in HIV positive patients/ K.Falasca, F.Vecchiet, C.Ucciferri, F.Vignale, P.Conti, A.Pizzigallo, A. Piattelli, J.Vecchiet // Eur J Med Res.-2008 Apr 30. - №13(4). - P.163-168 (визначення рівня експресії CD4⁺ і CD8⁺-Т-лімфоцитів та рівень цитокінів інтерлейкіну -2 (ІЛ-2), ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-10, фактора некрозу пухлин- α (ФНП- α), інтерферону- γ (ІНФ- γ) методом проточної цитометрії у ВІЛ-інфікованих пацієнтів із захворюваннями тканин пародонту).

Glick M. Oral manifestations associated with HIV-related disease as markers for immune suppression and AIDS / M.Glick, B.C.Muzyka, D.Xurie, L.M.Salkin // Oral Surg Oral Med Oral Pathol.-1994 Apr. - № 77(4). - P. 344-349(визначення рівня CD8⁺-Т-лімфоцитів імуногістохімічним методом в біоптаційному матеріалі пацієнтів зі статусом ВІЛ, що мають пародонтопатології та ураження слизової оболонки порожнини рота).

Nielsen H. Oral candidiasis and immune status of HIV-infected patients / H.Nielsen, K.D.Bentsen, L.Hejrtved, E.H.Willemoes, F.Scheutz, M.Schi0dt, K.Stoltze, J.J.Pindborg// J Oral Pathol Med.-1994 Mar. - №23(3). - P.140-143 (визначення рівня мітоген-індукованої експресії CD4⁺-Т-лімфоцитів в залежності від клінічної форми кандидозного стоматиту ВІЛ-позитивних людей).

Найбільш близьким до запропонованої корисної моделі по технічному результату та призначенню є спосіб діагностики запальних захворювань тканин пародонта у ВІЛ-інфікованих людей, що включає стандартизоване суб'єктивне та об'єктивне обстеження пацієнта, загальноприйняте клінічне обстеження порожнини рота, проведення індексної оцінки стану тканин пародонта, виконання лабораторних (морфологічних, мікробіологічних, імунологічних) методів обстеження (Н.Ф. Данилевский, А.Ф. Несин, Ж.И. Рахний. Заболевания слизистой оболочки полости рта/Проявления ВИЧ-инфекции в ротовой полости. - М., 2001). Оцінку стану імунологічної відповіді проводили шляхом визначення секреторного імуноглобуліну А (IgA) в ротовій рідині.

Недоліком відомого способу є недостатній ступінь його ефективності та інформативності щодо характеристики перебігу імунологічних та запальних процесів у ротовій порожнині, оскільки він передбачає визначення у ротовій рідині лише рівень IgA, що характеризує рівень локального неспецифічного імунного захисту у ротовій порожнині. Це не дає можливості оцінити баланс про- та протизапальних факторів, а також оцінити стрес-індуковані гормональні зміни в ротовій порожнині.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб діагностики запальних захворювань тканин пародонта у ВІЛ-інфікованих людей, шляхом удосконалення відомого, досягти підвищення інформативності оцінки імунологічного та гормонального стану порожнини

рота за допомогою визначення про- та протизапальних цитокінів і кортизолу у ротовій рідині пацієнтів та забезпечити підвищення ступеня ефективності діагностики.

Поставлена задача вирішують шляхом створення способу діагностики запальних захворювань тканин пародонта у ВІЛ-інфікованих, що включає стандартизоване суб'єктивне та об'єктивне обстеження пацієнта, загальноприйняте клінічне обстеження порожнини рота, проведення індексної оцінки стану тканин пародонта, забір та лабораторне дослідження ротової рідини, який, згідно корисній моделі, відрізняється тим, що додатково у ротовій рідині визначають імунну відповідь за рівнем концентрації основних про- та протизапальних цитокінів - інтерлейкіну-10 (ІЛ-10) та фактора некрозу пухлин- α (ФНП- α), а також стресорне навантаження за рівнем концентрації кортизолу.

Запропонований спосіб діагностики запальних захворювань тканин пародонта ВІЛ-інфікованих людей передбачає використання ротової рідини для оцінки стану імунної відповіді в порожнині рота, як найбільш оптимальний за інформативністю та легко доступністю та неінвазивний біологічний матеріал.

Визначення про- та протизапальної відповіді проводять шляхом визначення основних біомаркерів - ФНП- α та ІЛ-10 у відповідності до протоколів фірми виробника за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА) (ЗАТ "Вектор-Бест", Росія).

Визначення у ротовій рідині рівня концентрації кортизолу проводять відповідно до протоколів фірми виробника також за допомогою ІФА (DRG Instruments GmbH, Germany).

Запропонований спосіб здійснюють наступним чином.

Спочатку виконують стандартизоване суб'єктивне та об'єктивне обстеження пацієнта, загальноприйняте клінічне обстеження порожнини рота, проведення індексної оцінки стану тканин пародонта. Ротова рідина збирається в об'ємі 3 мл в пробірки типу "епендорф", центрифугується при 3000 об/хв. та використовується надосадожна рідина. Зберігається біологічний матеріал при -20°C у морозильній камері до проведення ІФА (Чайковська І.В., Прилуцький О.С., Майлян Е.А. Методика підготовки проб слини для визначення фактора некрозу пухлини альфа та інтерлейкіну- β // Імунологія та алергологія.-2005. - № 3. - С. 49-50).

Визначення рівня концентрації ФНП- α проводять у ротовій рідині за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу. На першій стадії аналізу в лунку полістирольного планшета, на дно якого нанесені моноклональні антитіла до ФНП- α , вносять досліджувані та контрольні зразки, які потім інкубують. ФНП- α , що знаходиться в зразках зв'язується з імобілізованими антитілами. Матеріал, що не зв'язався видаляється відмивкою. ФНП- α , що зв'язався, взаємодіє при інкубації з кон'югатом № 1 (біотинільовані антитіла до ФНП- α людини). Кон'югат № 1, що не зв'язався видаляється відмивкою. На третій стадії зв'язаний кон'югат № 2 взаємодіє при інкубації з кон'югатом № 2 (стрептавідин з пероксидазою хрому). Після третьої відмивки кількість зв'язаного кон'югата № 2 визначають за розвитком кольорової реакції між субстратом пероксидази хрому - пероксидом водню і хромогеном - тетраметилбензидином. Реакцію зупиняють додаванням розчину стоп-реагенту (концентрована соляна кислота) і вимірюють оптичну щільність розчинів в лунках при довжині хвилі 450 нм. Інтенсивність жовтого забарвлення пропорційна концентрації ФНП- α , що міститься в зразку.

Визначення рівня концентрації ІЛ-10 у ротовій рідині також проводиться твердофазним імуноферментним аналізом. Стадійність проведення аналогічна до вищеописаної методики. У тест-системі використовуються специфічні реагенти - моноклональні антитіла до ІЛ-10, що сорбовані на поверхні лунок полістирольного планшета, кон'югат поліклональних антитіл до ІЛ-10 з біотином та кон'югат стрептавідину з пероксидазою хрому. Облік результатів проводять шляхом вимірювання оптичної щільності розчинів в лунках при довжині хвилі 450 нм. Інтенсивність жовтого забарвлення пропорційна концентрації ІЛ-10, що міститься в зразку.

Визначення рівня концентрації вільного кортизолу у ротовій рідині ґрунтується на принципі конкурентної взаємодії та планшетному розподілі. Певна кількість кортизолу, що присутній у зразку зв'язується з кон'югатом, що містить комплекс кінських антитіл з пероксидазою хрому, які конкурують за місця зв'язування з мишачими моноклональними антитілами кортизол-антисироватки, що сорбовані на поверхні лунок. Через годину інкубації планшет відмивають, щоб зупинити конкурентну реакцію. Після додавання розчину субстрату визначають концентрацію кортизолу, що обернено пропорційна вимірюваній оптичній щільності при довжині хвилі 450.

Запропонований спосіб дозволяє за допомогою визначення рівня концентрації цитокінів та кортизолу в ротовій рідині оцінити стан місцевих імунологічних реакцій порожнини рота та стрес індукованих оральних змін.

Технічний результат досягають завдяки проведенню "сендвіч" варіанту твердофазного імуноферментного аналізу.

Приклад: Хворий В., 32 роки, ВІЛ-інфекція, III клінічна стадія звернувся до лікаря-стоматолога Полтавського обласного центру профілактики та боротьби зі СНІДом зі скаргами на кровоточивість ясен під час чищення зубів та прийому твердої їжі, на незначну рухливість зубів на верхній та нижній щелепах, на неприємний запах з рота.

Об'єктивно: загальний стан пацієнта задовільний, конституція нормостенічна, вираз обличчя спокійний, артикуляція нормальна. Обличчя симетричне, носо-губні та підборідна складки виражені помірно. Шкіра природного кольору, помірно волога, тургор та еластичність в нормі. В ділянці правої скроні та підборіддя визначаються пігментні плями світло-коричневого кольору, неправильної форми. Слизова оболонка очей незначно гіперемована. Червона облямівка губ блідо-рожевого кольору, суха. Визначаються тріщини в ангулярній зоні та лусочки по зоні Клейна. Регіонарні лімфатичні вузли щелепно-лицевої ділянки збільшені до 2 см в діаметрі, болісні при пальпації, еластичні, рухомі, з навколишніми тканинами та між собою не спаяні. Пальпація місць виходу гілок трійчастого нерва безболісна.

Ясна нижньої та верхньої щелеп набряклі, гіперемійовані. Міжзубні сосочки куполоподібної форми. При легкому дотику стоматологічним інструментом визначається кровоточивість. Пародонтальні кишені глибиною в середньому 3-5 мм, гнійний ексудат визначається в ділянках зруйнованих 15, 24 та 25. Відмічається патологічна рухомість II ступеня 22 та 26. Проба Шиллера-Писарева - позитивна (коричневого кольору), гігієнічний індекс за J.C.Green, J.R.Vermillion-1,19, індекс РМА - 60,6 %, ПІ за Ramfjord-4,17, КГП за Леусом - 3,7, індекс кровоточивості за Н.Р.Muhlemann-1,33.

Попередній стоматологічний діагноз: хронічний генералізований пародонтит II ступеня тяжкості.

Були проведені всебічні клініко-діагностичні обстеження з використанням запропонованого способу діагностики. Встановлено рівень концентрації ФНП- α в ротовій рідині 19,0 пг/мл та ІЛ-10-11,6 пг/мл. Рівень концентрації кортизолу становив 9,3 пг/мл. Високий рівень концентрації протизапального цитокіну ФНП- α в ротовій рідині ВІЛ-інфікованого вказує порушення локальних імунних механізмів і сприяє підтриманню процесів пародонтальної деструкції, що повинно бути враховано при призначенні лікувального комплексу. Не досить виражений рівень концентрації ІЛ-10 свідчить про активацію мікст-інфекції, що підтверджується анамнестично встановленими часто виникаючими супутніми патологіями (грибкові ураження нігтів та стоп, рецидивуючі вірусні інфекції, рецидивуючий оперізуючий лишай). Підвищений рівень концентрації кортизолу в ротовій рідині вказує на високий рівень нейротизму та тривожності, що потребує додаткової лікарської корекції.

Запропонованим способом діагностики було обстежено 45 пацієнтів віком від 23 до 46 років, які звернулися до Полтавського обласного Центру профілактики та боротьби зі СНІДом та Полтавської обласної клінічної стоматологічної поліклініки зі скаргами на біль та дискомфортні відчуття в порожнині рота, кровоточивість ясен, зміну кольору ясен, рухливість зубів, неприємний запах з порожнини рота тощо.

Пацієнти були поділені на групи 2 групи. Першу групу - дослідну - склали 37 ВІЛ-інфікованих осіб. Друга група - контрольна - 8 осіб без статусу ВІЛ, що не мали особливостей побутового та трудового анамнезу.

В ході дослідження ротової рідини обстежених отримані наступні результати: у дослідній групі середнє значення прозапального цитокіну ФНП- α дорівнювало $15 \pm 1,42$ пг/мл, а у контрольній групі - $2,41 \pm 0,38$ пг/мл ($p < 0,05$). Норма даного біомаркера у ротовій рідині здорових осіб складає $0,8 \pm 0,4$ пг/мл (Чайковська І.В., Прилуцький О.С., Майлян Е.А. Методика підготовки проб слини для визначення фактора некрозу пухлини альфа та інтерлейкіну- β // Імунологія та алергологія.-2005. - № 3. - С. 45-50). Рівень концентрації ФНП- α збільшується приблизно в 3 рази на фоні пародонтопатології. Ці дані співпадають з дослідженнями російських фахівців (Попова М.А., Логинов А.Г, Ветошкина М.С. Цитокиновая активность ротовой жидкости при иммунокорригирующей терапии хронического катарального гингивита // Аллергология и иммунология.-2008. - Т. 9, № 1. - С. 127).

При хворобах тканин пародонта та супутній ВІЛ-інфекції рівень концентрації ФНП- α збільшується майже в 14 разів. Отримані результати співпадають з даними іноземних вчених про підвищений рівень ФНП на фоні ВІЛ (Alpagot T., Konopka K., Bhattacharyya M., Gebremedhin S. The Association Between Gingival Crevicula Fluid TGF- β I Levels and Periodontal Status in HIV-1 Patients / J Periodontol.-2008. - Vol. 79, №1. - P123-130; Високий рівень ФНП- α в ротовій рідині пацієнтів зі статусом ВІЛ вважають достовірним прогностичним критерієм прогресування пародонтальної деструкції (Alpagot T., Konopka K., Bhattacharyya M., Gebremedhin S. The Association Between Gingival Crevicula Fluid TGF- β I Levels and Periodontal Status in HIV-1 Patients / J Periodontol.-2008. - Vol. 79, № 1. - P. 123-130).

Розрахунок показника рівня концентрації ФНП- α у групі ВІЛ-інфікованих осіб в залежності від клінічної стадії основного захворювання виявив тенденцію до зниження рівня концентрації даного прозапального цитокіну в залежності від стадії ВІЛ-інфекції. У осіб з I стадією ВІЛ рівень концентрації ФНП- α в ротовій рідині становить $16,32 \pm 1,12$, в осіб з II стадією ВІЛ - $11,4 \pm 2,78$, а при III стадії ВІЛ - $9,04 \pm 0,32$. Отже, на початкових стадіях розвитку ВІЛ-інфекції рівень ФНП- α в ротовій рідині максимальний і знижується з розвитком інфекційного процесу, що може свідчити про зниження імунного захисту.

Середнє значення концентрації ІЛ-10 в ротовій рідині для ВІЛ-інфікованих осіб склало $19,36 \pm 7,68$, а для осіб без статусу ВІЛ - $23,43 \pm 20,74$ ($p < 0,05$). Отже, рівень концентрації ІЛ-10 в ротовій рідині змінюється незначно, але демонструє великий розкид отриманих даних. Це може бути пов'язано з оклюзією імунопатогенетичних механізмів розвитку ВІЛ-інфекції та ко-інфекцій. Існують дані про достовірне підвищення продукції ІЛ-10 у пацієнтів з вірусними гепатитами "В" і "С" та про поглиблення імунного дисбалансу при мікст-інфікуванні ВІЛ (В.К. Веревщиков, В.М. Борзунов Цитокиновый профиль при микст-инфекции ВИЧ и вирусами гемоконтактных гепатитов // Аллергология и иммунология.-2008. - Т. 9, № 3. - С. 300; В.В. Новицкий, Е.В. Белобородова, Н.В. Рязанцева и др. Цитокин-продуцирующая способность мононуклеаров при хронических вирусных гепатитах "В" и "С" // Аллергология и иммунология.-2005. - Т. 6, № 2. -С. 257). Оскільки в дослідній групі майже всі обстежені в анамнезі мають опортуністичні інфекції, в тому числі 8 (21,6 %) осіб з гепатитами "В" та "С", можна припустити, що має місце дисбаланс імунної відповіді.

Запропонованим способом діагностики запальних захворювань тканин пародонта ВІЛ-інфікованих виявлена висока розповсюдженість захворювань тканин пародонта у ВІЛ-інфікованих, що досягає 100 %. При цьому генералізований пародонтит переважно хронічного перебігу є найпоширенішою патологією серед даного контингенту (близько 95 %).

Характерним є відсутність у обстежених ВІЛ-інфікованих осіб суб'єктивних відчуттів пов'язаних із станом тканин пародонта. Було виявлено ряд особливостей клінічного перебігу хвороб пародонта при ВІЛ-інфекції: не суттєво виражена венозна гіперемія, пастозність та набряк ясенного краю, підсилення судинного малюнка на альвеолярній частині ясен. При цьому жоден ВІЛ-інфікований обстежений не відмічав спонтанних кровотеч, а при зондуванні характерною була деяка відтермінованість кровоточивості. Аналіз пародонтологічного статусу ВІЛ-інфікованих засвідчив про наявність деструктивних явищ в тканинах пародонтального комплексу.

Запропонований спосіб діагностики запальних захворювань тканин пародонта ВІЛ-інфікованих людей передбачає використання ротової рідини для оцінки стану імунної відповіді в порожнині рота, як найбільш оптимальний за інформативністю та легко доступністю та неінвазивний біологічний матеріал.

Позитивний результат заявленого способу полягає в підвищенні інформативності оцінки імунологічного та гормонального стану порожнини рота, підвищенні ступеня ефективності діагностики запальних захворювань тканин пародонту ВІЛ-інфікованих людей.

Використання запропонованого способу призводить до створення можливостей прогнозування темпів розвитку патології тканин пародонта з огляду на стадію розвитку ВІЛ-інфекції, виявлення активних етіопатогенетичних факторів розвитку захворювання в кожному конкретному випадку та припустити наявність обтяжуючої супутньої патології. Він дозволяє підвищити ступінь ефективності діагностики запальних захворювань тканин пародонта ВІЛ-інфікованих.

Запропонований спосіб діагностики запальних захворювань тканин пародонта ВІЛ-інфікованих людей впроваджений на базі Полтавського обласного Центру профілактики та боротьби зі СНІДом та Полтавської обласної клінічної стоматологічної поліклініки. Він може бути використаний на амбулаторному прийомі в умовах стоматологічної поліклініки та спеціалізованих центрах допомоги ВІЛ-інфікованим та хворим на СНІД на етапі встановлення діагнозу.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб діагностики запальних захворювань тканин пародонта у ВІЛ-інфікованих, що включає стандартизоване суб'єктивне та об'єктивне обстеження пацієнта, загальноприйняте клінічне обстеження порожнини рота, проведення індексної оцінки стану тканин пародонта, забір та лабораторне дослідження ротової рідини, який **відрізняється** тим, що додатково у ротовій рідині визначають імунну відповідь за рівнем концентрації основних про- та протизапальних

цитокінів - інтерлейкіну-10 (ІЛ-10) та фактора некрозу пухлин- α (ФНП- α), а також стресорне навантаження за рівнем концентрації кортизолу.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601