



УКРАЇНА

(19) UA (11) 59571 (13) U
(51) МПК (2011.01)
A61B 5/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ МІКРОФЛОРИ В АТЕРОСКЛЕРОТИЧНО УРАЖЕНИХ СУДИНАХ

1

2

(21) u201011720

(22) 04.10.2010

(24) 25.05.2011

(46) 25.05.2011, Бюл.№ 10, 2011 р.

(72) КАЙДАШЕВ ІГОР ПЕТРОВИЧ, БОБРОВА
НЕЛЛЯ ОЛЕКСАНДРІВНА, СКОЧКО ОЛЬГА ВІК-
ТОРІВНА, ІЗМАЙЛОВА ОЛЬГА ВІТАЛІЄВНА,
ШЛИКОВА ОКСАНА АНАТОЛІЇВНА

(73) ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
УКРАЇНИ "УКРАЇНСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛО-
ГІЧНА АКАДЕМІЯ"

(57) Спосіб визначення мікрофлори в атероскле-
ротично уражених судинах, що включає виділення
ДНК з наступною ампліфікацією та детекцією ре-
зультатів, який **відрізняється** тим, що як біологіч-
ні зразки використовують тканини уражених судин,
виділення ДНК здійснюється лізуючим методом, а
мультиплексна полімеразна ланцюгова реакція
виконується в режимі реального часу.

Корисна модель, що заявляється, відноситься до області біології та медицини і може бути вико-
ристана для діагностики складу мікрофлори в ате-
росклеротично уражених судинах з метою ранньої
діагностики та вибору методів антибіотичної тера-
пії.

Відомо, що хронічні інфекційні захворювання пародонту є фактором ризику багатьох системних захворювань. Показано, що мікроорганізми - пред-
ставники пародонтопатогенної мікрофлори (*Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*), хламідії (*Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*), *Helicobacter pylori*, віруси (*Virus influenza*, *measles virus*, *Cytomegalovirus*, *Herpesviruses*), *Bordetella pertussis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis* та ін. - приймають участь не тільки в патогенезі запальних захворювань пародонту, але й атеросклерозу, стенокардії, інсульту, пневмонії, цукрового діабету, впливають на стан імунної та ендокринної систем [Грудянов А. І. Частота виявлення різних представителів пародонтопатогенної мікрофлори при пародонтитеразної ступені тяжкості / А. І. Грудянов, В. В. Овчинникова // *Стоматология*. - 2009. - № 3. - С. 34-37; Zahrani. M. C. Periodontitis and cardiovascular disease; a review of shared risk factors and new findings supporting a causality hypothesis // M. C. Zahrani., R. F. Koyal, N. F. Bissada. - *Quintessence Int.* - 2006. - № 37. - P.11-18].

Відомо ряд способів визначення умовно-
патогенних та патогенних мікроорганізмів у біоло-
гічних зразках, які базуються на методах мікроско-
пії, бактеріологічних методах тощо. За допомогою
фазово-контрастної мікроскопії та мікроскопії в
темному полі визначають морфотип пародонтопа-
тогенів. Ідентифікацію виділених штамів прово-
дять на основі комплексу морфологічних, культу-
ральних та біохімічних ознак. Використовують
імунологічні дослідження, які засновані на вияв-
ленні реакції антиген-антитіло, аглютинації латек-
су, проточній цитофлюориметрії, імуносорбентно-
му аналізі та імунофлюорисцентній мікроскопії.
[Ушаков Р. В. Микробиологические и молекулярно-
генетические показания назначения антибактери-
альной терапии // Р. В. Ушаков, В. Н. Царев. - М:
МИА. - 2004. - С. 4; Бондаренко И. С. Свойство
пародонтопатогенной микрофлоры влияют на сни-
жение интенсивности развития кариесных процес-
сов / И. С. Бондаренко, И. В. Маланин // *Российс-
кая Академия Естествознания*. - 2007. - № 12. - С.
5-8; Очерки иммунобиологии слизистой оболочки
полости рта / Кайдашев И. П., Шинкевич В. И.,
Король Д. М. и др.]; под ред. И. П. Кайдашева. -
Полтава «Полимет», 2008 - 304].

Найбільш близьким до способу, що заявляється,
є спосіб визначення пародонтопатогенних мік-
роорганізмів у пародонтальних кишнях хворих на
пародонтит методом полімеразної ланцюгової
реакції (ПЛР). Суть цього способу полягає в тому,
що відбір дослідного матеріалу виконують з паро-
донтальної кишені пацієнта за допомогою стері-

(19) UA (11) 59571 (13) U

льного паперового штифта з наступним виділенням ДНК методом термо-коагуляційного кондиціонування, із подальшою ампліфікацією ДНК зі специфічною парою праймерів та ідентифікацією пародонтопатогенних ДНК *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* методом електрофорезу [Роль мікробного фактора в розвитку пародонтита / Н. П. Ярынич-Бучинская, И. П. Кайдашев, П. Н. Скрипников и др. // Стоматолог. - 2007. - № 10, Т. 113, - № 10. - С. 4-5.].

Недоліком існуючого способу є те, що він визначає обмежену кількість мікроорганізмів мікрофлори в біологічних зразках, відсутність внутрішнього контролю, що може призвести до появи хибно негативних результатів, неможливість визначення кількісного складу окремих видів мікроорганізмів.

В основу корисної моделі поставлено завдання розробити спосіб визначення мікрофлори в атеросклеротично уражених судинах, шляхом удосконалення відомого способу, досягти визначення максимальної кількості мікроорганізмів мікрофлори та кількісного складу окремих видів умовно та умовно-патогенних мікроорганізмів в атеросклеротично уражених судинах, оцінити стан мікроцитозу, виявити рівень дисбалансу мікрофлори в атеросклеротично уражених судинах та покращити ефективність лікувально-профілактичних заходів при серцево-судинних патологіях.

Поставлена задача вирішується створенням способу визначення мікрофлори в атеросклеротично уражених судин, що включає виділення ДНК з наступною ампліфікацією та детекцією результатів, який, згідно корисної моделі, відрізняється тим, що як біологічні зразки використовують тканини уражених судин, виділення ДНК проводять методом сорбції ДНК на сорбенті та використанням мультиплексної ПЛР із в режимі реального часу.

Заявлений спосіб виконується наступним чином:

Була відібрана тканина з наявністю на стінці судини атеросклеротичної бляшки у померлої людини. Для цього відрізали шматочок судини розміром 2×3 мм та додавали 100 мкл лізуючого розчину. Інкубували у твердотілому термостаті при тем-

пературі 55 °С до повного розчинення тканини (2-4 години), центрифугували 5 сек. при 8 тис. об/хв. Далі додавали 300 мкл розчину I та 10 мкл суспензії сорбенту. Суміш інкубували 10 хв. при кімнатній температурі з періодичним струшуванням. Центрифугували 15 хв. при 8 тис. об/хв., видаляли супернатант, додавали розчин II, струшували на вортексі, знову центрифугували. Відбирали супернатант та продовжували 2-х кратне промивання осаду з розчином III. Після останнього відбирання супернатанту осад просушували 5 хв. при 50 °С, додавали 50 мкл ТЕ-буфера, струшували на вортексі, інкубували 5 хв. при 50°С, знову центрифугували («ЛИТЕХ», Москва, Росія). Таким чином отримували розчин ДНК, який використовували для подальшої ампліфікації. Ампліфікацію проводили методом мультиплексної ПЛР в режимі реального часу з використанням набору реагентів (ООО «НПО ДНК-Технологія», Москва), який призначений для визначення загальної маси мікроорганізмів біологічного зразку, *Lactobacillus* spp., *Enterobacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas* spp., *Eubacterium* spp., *Mycoplasma genitalium+hominins*, *Candida* spp. Для цього в стрип з реакційною сумішшю додавали 10 мкл ретельно перемішаної Таг-полімерази, нашаровували краплю мінерального масла та 5,0 мкл розчину отриманої ДНК, не пошкоджуючи шар парафіну. Стрип центрифугували на вортексі при 1000 тис об/хв. 5 сек. Ампліфікацію проводили на детектувальному ампліфікаторі ДТ-322 (ООО «НПО ДНК-Технологія», Москва) в режимі реального часу. Підрахунок результатів ПЛР мікроорганізмів судини з атеросклеротичною бляшкою проводили за допомогою програмного забезпечення. Відмічено, що концентрація біомаси біологічного зразку становила 5,3 log. Також знайдено *Lactobacillus* spp. концентрацією 4,3 log та *Eubacterium* spp. 5,6 log.

Позитивний результат від заявленого способу визначення мікрофлори атеросклеротично уражених судин полягає у виявленні умовно-патогенних та патогенних мікроорганізмів та їх участі у розвитку патологічних станів, що необхідно враховувати при профілактиці та терапії серцево-судинних захворювань.