



УКРАЇНА

(19) UA (11) 59572 (13) U  
(51) МПК (2011.01)  
A61B 5/00  
G01N 1/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальністю  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ПАРОДОНТОПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ В АТЕРОСКЛЕРОТИЧНИХ БЛЯШКАХ

1

(21) u201011721

(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 ВАТАЛІЇВНА,  
ШЛИКОВА ОКСАНА АНАТОЛІЇВНА(73) ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД  
УКРАЇНИ "УКРАЇНСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛО-  
ГІЧНА АКАДЕМІЯ"

2

(57) Спосіб визначення пародонтопатогенних мік-  
роорганізмів в атеросклеротичних бляшках, що  
включає виділення ДНК, ампліфікацію методом  
полімеразної ланцюгової реакції, їх ідентифікацію  
за допомогою електрофорезу, який **відрізняється**  
тим, що як біологічні зразки використовують тка-  
нини судин з атеросклеротичною бляшкою, а виді-  
лення ДНК з них проводять лізуючим методом.

Корисна модель, що заявляється, належить до області біології та медицини і може бути використана для діагностики серцево-судинної патології.

Відомо, що наявність пародонтогенних інфекцій при хронічних захворюваннях пародонта є фактором ризику розвитку серцево-судинної патології [Vitrov L. Bacterial internalization in periodontitis / L. Vitkov, W.D. Krautgarther, M. Hannig // Oral Microbiol Immunol. - 2005. - Vol. 20, №5. - P. 317-321]. Найбільш розповсюдженими представниками пародонтопатогенної мікрофлори є *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola* та ін., які є не тільки причиною розвитку запальних захворювань пародонту, але й атеросклерозу, стенокардії, інсульту тощо. Пародонтопатогени сприяють інфільтрації судинної стінки імунокомпетентними клітинами, проліферації гладеньком'язових клітин, жировій дистрофії ендотеліальних клітин, адгезії тромбоцитів до ендотелію, відкладенню холестерину, що може призводити до формування атеросклеротичних бляшок [Microbiological profile of early onset/aggressive periodontitis patients / J.J. Kamma, M. Nakou, R. Gmur. [et.al] // Oral Microbiol Immunol. - 2004. - Vol. 19, №5. - P. 314-321].

Відомо ряд способів визначення пародонтопатогенів у біологічних матеріалах. Для визначення маркерних пародонтопатогенних видів мікроорганізмів використовують бактеріологічні методи дослідження в анаеробних умовах (по класифікації ВОЗ). Ідентифікацію виділених штамів проводять

на основі комплексу морфологічних, культуральних та біохімічних ознак [Ушаков Р.В. Микробиологические и молекулярно-генетические показания назначения антибактеральной терапии // Р.В. Ушаков, В.Н. Царев. - М.: МИ А. - 2004. - С. 4; Бондаренко И.С. Свойство пародонтопатогенной микрофлоры влиять на снижение интенсивности развития кариесных процессов / И.С. Бондаренко, И.В. Маланын // Российская Академия Естествознания. - 2007. - №12. - С. 5-8]. Використовують імунологічні дослідження, які засновані на виявленні реакції антиген-антитіло, аглютинації латексу, проточній цитофлюориметрії, імуносорбентному аналізі та імунофлюорисцентній мікроскопії. За допомогою фазово-контрастної мікроскопії та мікроскопії в темному полі визначають морфотип пародонтопатогенів [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 мікроорганізмів у пародонтальних кишнях хворих на пародонтит методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Суть цього способу полягає в тому, що відбір дослідного матеріалу виконують з пародонтальної кишені пацієнта за допомогою стерильного паперового штифта з наступним виділенням ДНК за допомогою методу термокоагуляційного кондиціонування, ампліфікацією ДНК із специфічною парою праймерів та ідентифікацією пародонтопатогенних ДНК *Prevotella*

(19) UA (11) 59572 (13) U

intermedia, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* за допомогою електрофорезу [Роль микробного 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 не дозволяє визначити пародонтопатогену мікрофлору в уражених судинах.

В основу корисної моделі поставлене завдання розробити спосіб визначення пародонтопатогенних мікроорганізмів в атеросклеротичних бляшках, удосконалення відомого способу, шляхом використання в якості біологічного матеріалу тканин судин з атеросклеротичними бляшками та застосуванням методу ДНК із цих тканин, досягти визначення пародонтопатогенних мікроорганізмів в атеросклеротичних бляшках судин, підтвердити їх роль та участь в розвитку серцево-судинних захворювань, що дозволить своєчасно виявляти групу ризику хворих, призначити патогенетичну терапію та забезпечити підвищення ефективності лікувально-профілактичних заходів при даній патології.

Поставлена задача вирішується створенням способу визначення парадонтопатогенних мікроорганізмів в атеросклеротичних бляшках, що включає виділення ДНК, ПЛР із наступною ампліфікацією, їх ідентифікацією за допомогою електрофорезу, який згідно корисної моделі відрізняється тим, що як біологічні зразки використовують тканини судин з атеросклеротичними бляшками, а виділення ДНК з них проводять лізуючим методом.

Заявлений спосіб виконується наступним чином:

Було відібрано п'ять тканин судин без наявності атеросклеротичної бляшки (контрольна група) та 31 тканина з наявністю на стінці судини атеросклеротичної бляшки (дослідна група) у померлих людей. Для виділення ДНК парадонтопатогенів використовували реагенти набору для виділення ДНК із біоптату «ХЕЛИКОПОЛ» («ЛИТЕХ», Москва, Росія). Для цього відрізували шматочок судини розміром 2×3 мм та додавали 100 мкл лізуючого розчину. Інкубували у твердотілому термостаті при температурі 55°C 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°C, додавали 50 мкл ТЕ-буфера, струшували на вортексі, інкубували 5 хв при 50°C, знову центрифугували. Таким чином отримували розчин ДНК, який використовували для подальшого якісного визначення парадонтопатогенів. Ампліфікацію ДНК парадонтопатогенів проводили на ампліфікаторі «Терцик» (ДНК-Технологія, Москва, Росія) із додаванням специфічних праймерів, використовуючи набір «МультиДент» (ООО НПФ «Гентех», Росія). Ідентифікацію ДНК проводили за допомогою електрофорезу в 2% агарозному гелі, забарвленому етидіумом бромідом із подальшою візуалізацією в УФ світлі. Результати ПЦР вважали позитивними при наявності специфічної люмінесценції, яка співпадала із рівнем позитивного контрольного зразка, негативними - при відсутності специфічної люмінесценції в зразку.

Математичну обробку отриманих даних проводили з використанням програмного пакету «STATISTICA 7.0 for Windows» і електронних таблиць MS Excel. Статистично значимими вважали відмінності при  $p < 0,05$ .

Ефективність способу визначення парадонтопатогенних мікроорганізмів у тканинах судин із атеросклеротичними бляшками показана у таблиці.

Отримані результати встановили, що найчастіше у 65% випадків у атеросклеротичних бляшках зустрічався збудник *Porphyromonas gingivalis*. На другому місці за частотою була *Treponema denticola* - 42%. Рідко зустрічалися *Prevotella intermedia* (31,7%) та *Bacteroides forsythus* (13%). Приблизно у половині випадків (51,6%) було виявлено два та більше парадонтопатогенних мікроорганізмів. Лише у двох випадках із дослідженої бляшки не було виділено жодного парадонтопатогенного мікроорганізму.

У тканинах судин контрольної групи без наявності атеросклеротичної бляшки парадонтопатогенів не виявлено.

Таблиця

Кількість парадонтопатогенних мікроорганізмів у атеросклеротичних бляшках

Парадонтопатогенні мікроорганізми	Контрольна група, n=5 (%)	Дослідна група, n=31 (%)
<i>Prevotella intermedia</i>	0	2 (31,7)
<i>Bacteroides forsythus</i>	0	4 (13)
<i>Treponema denticola</i>	0	13 (42)
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	0	10 (32,3)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	0	20 (65)
Наявність 1 мікроорганізму	0	9 (29,0)
Наявність 2 і більш мікроорганізмів	0	16 (51,6)
$\chi^2$ Пірсона з поправкою Йейтса		8,39 ( $p=0,0038$ )

Позитивний результат від заявленого способу визначення пародонтопатогенних мікроорганізмів в атеросклеротичних бляшках судин полягає у підтвердженні участі пародонтопатогенної мікроф-

лори у розвитку атеросклерозу, що необхідно враховувати при профілактиці та терапії серцево-судинних захворювань.