



УКРАЇНА

(19) UA (11) 58163 (13) A

(51) 7 A61C17/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**  
**ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ**  
**НА ВІНАХІД**Видається під  
відповідальність  
власника  
патенту**(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ІМУНОЛОГІЧНОГО СТАНУ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ПОРОЖНИНИ РОТА**

1

2

(21) 2002108169

(22) 15 10 2002

(24) 15 07 2003

(46) 15 07 2003, Бюл №7, 2003 р

(72) Кайдашев Ігор Петрович, Шинкевич Вікторія Ігорівна

(73) Кайдашев Ігор Петрович, Шинкевич Вікторія Ігорівна

(57) Спосіб оцінки імунологічного стану слизової оболонки порожнини рота, що включає відбір ма-

теріалу із захопленням слизової оболонки разом із власною пластинкою, виготовлення із матеріалу зрізів, обробку зрізів антитілами до імунокомпетентних клітин, візуалізацію антитіл та оцінку кількості й розташування цих клітин, який відрізняється тим, що як антитіла використовують антитіла до  $\gamma$ -,  $\delta$ - Т- клітинних рецепторів лімфоцитів

Винахід відноситься до галузей біології та медицини і може бути використаний для оцінки імунологічного стану слизової оболонки порожнини рота за фізіологічних умов та при стоматологічних захворюваннях, для моніторингу патологічного процесу

Відомі такі способи оцінки імунологічного стану слизової оболонки визначення рівня  $\text{IgA}$  в ротовій рідині [Данилевський Н Ф, Борисенко А В Заболевания пародонта -Київ «Здоров'я» -2000 -461с], визначення фагоцитарної активності лейкоцитів [Данилевський Н Ф, Борисенко А В Заболевания пародонта -Київ «Здоров'я» -2000 -461с], цитологічне дослідження слизової оболонки порожнини рота [Данилевський Н Ф, Несин О Ф, Рахнін Ж І Захворювання слизової оболонки порожнини рота -Київ "Здоров'я" -1998 -406с]

Найближчим способом до заявляемого є спосіб оцінки функціонального стану слизової оболонки порожнини рота за допомогою маркерів CD3, CD4, CD8, CD20, CD16, CD14 та HLA-DR [Пат 2001096503 Україна, МПК 7 A61C17/00 Спосіб оцінки функціонального стану слизової оболонки порожнини рота Пат 2001096503 Україна, МПК 7 A61C17/00/ Кайдашев І П, Ткаченко П І, Куроедова В Д, Карасюнок О О, Шинкевич В І, Баштовенко О А (Україна), №41426, Заявл 24 09 2001, Опубл 10 06 2002 -Зс], п 45519 від 15 08 2002р

Для його здійснення під анестезією відбирають біоптат слизової оболонки порожнини рота, з матеріалу виготовляють кріостатні зрізи 5-7мкм, їх фіксують в льодяному ацетоні Використовуючи

маркери (антитіла) до рецепторів, що складають фенотип імуноцитів, визначають або ідентифікують клітини за допомогою імуногістохімічного аналізу Визначають CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup> клітини, які присутні в слизовій оболонці порожнини рота Метод включає три реакції, сутність яких полягає у взаємодії клітинних антигенів із специфічними антитілами та прояву цієї реакції Для методу використовується другий шар антитіл, мічених біотином- В результаті третьої реакції взаємодіють біотин з стрептавідинпероксидазою Клітини підраховують, характеризують їх локалізацію Візуалізація проводиться з використанням діамінобензидину солянокислого Кінцевим продуктом гістохімічної реакції є нерозчинний пігмент коричневого кольору, що випадає в місці знаходження антигену

Недоліком даного способу являється недостатня інформативність щодо характеристики внутрішньо епітеліальних лімфоцитів, зумовлена наступними обставинами Серед внутрішньо епітеліальних лімфоцитів слизової оболонки переважають  $\gamma$ -,  $\delta$ - (гама-, дельта-) Т- лімфоцити, що підкреслює значну роль цих клітин в роботі імунологічного апарату слизової оболонки [Дранник Г Н Клиническая иммунология и аллергология - Одесса «АстроПринт» -1999 -603 с, Хаитов Р М Физиология иммунной системы // Российский физиологический журнал им Сеченова -2000 -Т 86, №3 -С 252-267], а їх виявлення є дуже важливим,  $\gamma$ -,  $\delta$ - Т-лімфоцити можуть нести CD4 або CD8 молекули на своїй поверхні, як і  $\alpha$ -,  $\beta$ -

(19) UA (11) 58163 (13) A

лімфоцити, тому антитіла CD4, CD8 не надають можливості з'ясувати походження лімфоцитів, розташованих внутрішньо-епітеліально

В основу винаходу поставлено задачу створити спосіб, шляхом удосконалення відомого, щоб досягти підвищення інформативності та достовірності оцінки імунологічного стану слизової оболонки порожнини рота за допомогою визначення кількості та розташування  $\gamma$ -,  $\delta$ - Т-лімфоцитів, що дозволить судити про рівень імунних реакцій

Поставлену задачу вирішують створенням способу дослідження, що включає відбір матеріалу із захопленням слизової оболонки разом із власною пластинкою, виготовлення із матеріалу зрізів, обробку зрізів антитілами до  $\gamma$ -,  $\delta$ - Т-клітинних рецепторів лімфоцитів, візуалізацію антитіл та оцінку кількості й розташування цих клітин

Спосіб оцінки здійснюється наступним шляхом

1 Матеріал для дослідження одержується за допомогою біопсії епітелію з власною та/або підслизовою пластинкою У разі проведення вказаної процедури під місцевою анестезією, важливо уникати інфільтрації анестетиком безпосередньо ділянки, де намічена біопсія, оскільки при цьому не виключена можливість змін архітекtonіки тканини Отримують криостатні зрізи, та фіксують їх в охолодженому ацетоні

2 Зрізи обробляють моноклональними антитілами до  $\gamma$ -,  $\delta$ - Т-ланцюгів Т-клітинного рецептора

3 Наступним етапом виявляють первинні моноклональні антитіла - до  $\gamma$ -,  $\delta$ - Т-клітинного рецептора

4 Візуалізують реакцію антиген - антитіло за допомогою хромотропа

5 Проводиться дозabarвлення препаратів гематоксиліном, що дозволяє оцінити співвідношення виявлених імунітетів з гістологічною будовою слизової оболонки

6 Ідентифікують  $\gamma$ -,  $\delta$ - Т-лімфоцити, оцінюють їх кількість, локалізацію відносно шарів епітеліоцитів та солоккалізацію, особливості будови, інші характеристики

#### Приклад використання 1

Дослідження проводилося для слизової оболонки ясен при хронічному катаральному гінгіві середнього ступеня важкості у дітей, за допомогою непрямого біотин - екстравідін - пероксидазного методу [Дж Полак, С Ван Норден Введение в иммуноцитохимию Современные методы и проблемы // Перевод с англ Глуховой М А, под ред Хрущова Н Г-М «Мир» -1987 -74с ] В якості первинних антитіл використовували  $\gamma$ -,  $\delta$ - моноклональні мишачі антитіла Друга реакція полягала у зв'язуванні первинних  $\gamma$ -,  $\delta$ - моноклональних антитіл антитілами, міченими біотином Екстравідін використовувався у якості третього шару і виявляв біотинильовану мткку

Візуалізація реакції проводилася за допомогою діамінобензидину солянокислого Отримані результати, в загальних рисах, показали збільшення кількості активованих  $\gamma$ -,  $\delta$ - Т-лімфоцитів без зміни їх локалізації

#### Приклад 2

Проведено дослідження слизової оболонки міжзубного сосочка в області встановленого дентального імплантата з титанового сплаву непрямым Імуноферментним методом [Дж Полак, С Ван Норден Введение в иммуноцитохимию Современные методы и проблемы // Перевод с англ Глуховой М А, под ред Хрущова Н Г-М «Мир» -1987 -74с ] В якості первинних моноклональних антитіл використовували  $\gamma$ -,  $\delta$ - моноклональні мишачі антитіла Другим шаром служили антитіла кози до IgG миші, мічені пероксидазою хрина (anti IgG-HRP) Візуалізацію проводили за допомогою 3-аміно-9-етилкарбазола (Sigma, USA) Продукт реакції мав червоне забарвлення

Було виявлено зміни імунологічного апарату слизової оболонки, які стосувалися  $\gamma$ -,  $\delta$ - Т-лімфоцитів, та проявлялися зменшенням їх числа в епітелі та перерозподілом по шарах у вигляді сукупчень в ділянках дистрофічне змінених епітеліоцитів

#### Приклад 3

Було проведено дослідження слизової оболонки ясен при генералізованому пародонтиті середнього ступеня важкості за допомогою прямого імунофлуоресцентного методу В якості первинних моноклональних антитіл використовували  $\gamma$ -,  $\delta$ - моноклональні антитіла, мічені флуоресцеїнізотіоціанатом (ФІТЦ) Забарвлений зріз оцінювали під мікроскопом з ультрафіолетовою оптикою, при цьому в місцях зв'язування антитіл спостерігали зелену флуоресценцію

#### Приклад 4

Досліджували слизову оболонку ясен при генералізованому пародонтиті важкого ступеня за допомогою непрямого імунофлуоресцентного методу В якості первинних моноклональних антитіл використовували  $\gamma$ -,  $\delta$ - мишачі моноклональні антитіла Другий шар антитіл був представлений антитілами кози до первинних специфічних антитіл і мічений ФІТЦ Забарвлений зріз оцінювали під мікроскопом з ультрафіолетовою оптикою, при цьому в місцях зв'язування антитіл спостерігали зелену флуоресценцію

#### Приклад 5

Досліджували слизову оболонку, що вкриває зону остеомієлгу нижньої щелепи за допомогою пероксидаза- антипероксидазного методу В якості первинних моноклональних антитіл використовували  $\gamma$ -,  $\delta$ - кролячі моноклональні антитіла Другий шар формували немічені антитіла кози до кролячого IgG Третій шар складався з комплексу кролячих антитіл до пероксидази, зв'язаних з пероксидазою (ПАП-комплекс) Реакцію візуалізували за допомогою 3-аміно-9-етилкарбазола (Sigma, USA) В місцях зв'язування антигену спостерігалося червоне забарвлення

Представлені результати досліджень, проведених запропонованим методом, дозволяють зробити висновок про високу інформативність аналізу імунологічного стану слизової оболонки на глибокому структурному рівні, який уточнює роль імунних механізмів у патогенезі захворювань слизової оболонки

