



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **116178** (13) **C2**
(51) МПК (2017.01)
G01N 33/48 (2006.01)
A61B 10/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2017 00396</p> <p>(22) Дата подання заявки: 16.01.2017</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 12.02.2018</p> <p>(41) Публікація відомостей про заяву: 25.10.2017, Бюл.№ 20</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 12.02.2018, Бюл.№ 3</p>	<p>(72) Винахідник(и): Кривенко Людмила Станіславівна (UA), Назарян Розана Степанівна (UA), Гаргін Віталій Віталійович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, пр. Науки, 4, м. Харків, 61022 (UA)</p> <p>(74) Представник: Голданська Анна Вадимівна</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Cem Evereklioglu et al. Increased nitric oxide production in patients with Behcet's disease: Is it a new activity marker? J. am acad dermatol., 2002, Vol. 46, no. 1, P. 50-54 Kimi haru Ambe et al. Production and physiological role of NO in the oral cavity. Japanese dental science review, Elsevier, 2016, Vol. 52. P. 14-21 Wolf G. Nitric oxide and nitric oxide synthase: biology, pathology, localization. Histol. Histopathol., 1997, Vol. 12, P. 251-261 Brennan P.A. The role of nitric oxide in oral diseases. Archives of oral biology, Elsevier, 2003, Vol. 48, P. 93-100 Alba Rossi-George et al. Nitric oxide biochemistry: pathophysiology of nitric oxide-mediated protein modifications. Contemporary clinical neuroscience, Oxidative neural injury, 2009, P. 29-44 [Інтернет публікація], URL: https://www.springer.com/978-1-60327-341-1</p>
---	---

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ АКТИВНОСТІ ПАТОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ПОРОЖНИНИ РОТА ПРИ АТОПІЧНИЙ ПАТОЛОГІЇ

(57) Реферат:

Винахід належить до способу оцінки активності патологічного процесу порожнини рота, який включає визначення рівня синтази оксиду азоту в біологічних зразках, де у пацієнтів з atopічною патологією активність синтази оксиду азоту (NO-синтази) визначають в м'яких тканинах ротової порожнини за допомогою імуногістохімічного дослідження шляхом постановки непрямой імунопероксидазної реакції з моноклональними антитілами до ендотеліальної (eNOs) та індукцибельної (iNOs) фракцій NO-синтази з візуалізацією реакції за допомогою набору UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen, патологічний процес діагностують при виявленні eNOs в ендотелії змінених та незмінених ділянок слизової оболонки ротової порожнини, в тому числі і з позасудинною локалізацією, а саме у власній пластинці слизової і підлягаючій м'язовій пластинці, та при найбільшій активності iNOs навколо запальних

UA 116178 C2

клітин в товщині епітеліального пласта змінених ділянок, а як активний патологічний процес оцінюють при підвищенні активності іNOs фракції NO-синтази в 2 рази та більше у порівнянні з контрольними вимірами інтактних тканин.

Винахід належить до медицини, а саме до стоматології та патологічної анатомії, і може бути використаний для оцінки активності патологічного процесу порожнини рота (ПР) при atopічній патології (АП).

Зростаюча поширеність бронхіальної астми, atopічного дерматиту та алергічного риніту обумовлює необхідність вирішення проблем діагностики та лікування патологічних процесів в ротовій порожнині таких хворих. Особливого значення набуває при цьому задача оцінки активності патологічного процесу порожнини рота при atopічній патології.

У сучасних концепціях патогенезу atopічних процесів ПР вирішальне значення надається порушенням в імунній системі. За даними багатьох вчених у пацієнтів з АП виявлено пригнічення клітинного імунітету [Рабинович О.Ф. Рецидивуючий афтозний стоматит: класифікація, клінічні форми і лікування / О.Ф. Рабинович, І.М. Рабинович // Стоматологія. - 2010. - Т. 78, № 3. - С. 76-79]. Також важливу роль відводять аутоімунним процесам, які викликають тканинні пошкодження. Певне значення має і так звана перехресна імунна реакція: пригнічення фагоцитарної активності нейтрофілів і зниження продукції ІЛ-1 та ІЛ-2, які визначають тяжкість перебігу АП [Burgan S.Z. Hematologic status in patients with recurrent aphthous stomatitis in Jordan / S.Z. Burgan, F.A. Sarwair, Z.O. Amarin // Saudi Med J.-2009. - Vol. 27, № 3. - P. 381-384].

Тривалий запальний процес призводить до виснаження захисних механізмів на рівні слизової оболонки, що супроводжується зміною рівня гуморального імунітету, а також деяких факторів неспецифічного захисту порожнини рота. Пригнічення місцевого імунітету порожнини рота впливає як на виникнення АП, так і на його перебіг та виникнення рецидивів надалі.

Оцінюють активність патологічного процесу ПР при АП за показниками імунного статусу і неспецифічного захисту в ротовій рідині та крові.

Так, наприклад, при активності АП реєструють депресію Т-системи імунітету, що виражається в зниженні кількості та функціональної активності Т-лімфоцитів, порушенні субпопуляції Т-лімфоцитів, вираженому зменшенні кількості Т-хелперів та збільшенні Т-супресорів [Особенности иммунного реагирования при atopии у детей / О.П. Турина, Е.А. Дементьева, А.Е. Блинов и др. // Педиатр. - 2014. - Т. 5, № 4. - С. 95-103].

Зафіксовані зміни В-системи імунітету, що проявляються збільшенням кількості В-лімфоцитів, підвищенням рівня сироваткового імуноглобуліну G (IgG), циркулюючих імунних комплексів, зниженням рівня імуноглобуліну M (IgM) [Шумна Е. Характеристика гормонального профілю дітей з алергічними захворюваннями / Т. Шумна // Медичні перспективи.-2013. - Т. XVIII, № 1. - С. 64-70; Медицинская реабилитация детей с atopическим дерматитом (обзор) / К.В. Котенко, М.А. Хан, Н.А. Лян и др. // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. - 2016. - Т. 93, № 5. - С. 66-70; Особенности иммунного реагирования при atopии у детей / О.П. Турина, Е.А. Дементьева, А.Е. Блинов и др. // Педиатр. - 2014. - Т. 5, № 4. - С. 95-103].

Відомо, що при рецидивуючому АП знижена концентрація лізоциму та підвищений вміст бета-лізину в сироватці крові, зменшений вміст фракції комплементу С3, С4 і підвищений рівень фракції С5. Зменшується вміст секреторного та сироваткового імуноглобуліну А (IgA) в ротовій рідині [Особенности иммунного реагирования при atopии у детей / О.П. Турина, Е.А. Дементьева, А.Е. Блинов и др. // Педиатр. - 2014. - Т. 5, № 4. - С. 95-103; Аравийская Е.Р. Микробном: новая эра в изучении здоровой и патологически измененной кожи / Е.Р. Аравийская, Е.В. Соколовский // Вестник дерматологии и венерологии. - 2016. - № 3. - С. 102-109].

Останнього часу як маркер активності патологічного процесу в порожнині рота пропонують використовувати визначення рівня оксиду азоту, зокрема при афтозному стоматиті [Increased nitric oxide production in patients with Behcet's disease: is it a new activity marker? / С. Evereklioglu, Y. Turkoz, H. Er et al. // J Am Acad Dermatol.-2002. - Vol. 46 (1). - P. 50-54].

Даний спосіб оцінки активності патологічного процесу порожнини рота при atopічній патології є найбільш близьким до того, що заявляється, за технічною суттю і результатом, який може бути досягнутим, тому його вибрано за прототип.

В основу винаходу поставлено задачу створення ефективного способу оцінки активності патологічного процесу порожнини рота при atopічній патології.

Задачу, яку поставлено в основу винаходу, вирішують тим, що у відомому способі оцінки активності патологічного процесу порожнини рота, який включає визначення рівня синтази оксиду азоту в біологічних зразках, згідно з винаходом, у пацієнтів з atopічною патологією активність синтази оксиду азоту (NO-синтази) визначають в м'яких тканинах ротової порожнини за допомогою імуногістохімічного дослідження шляхом постановки непрямої імунопероксидазної реакції з моноклональними антитілами до ендотеліальної (eNOs) та індукцибельної (iNOs)

фракцій NO-синтази з візуалізацією реакції за допомогою набору UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen, патологічний процес діагностують при виявленні eNOs в ендотелії змінених та незмінених ділянок слизової оболонки ротової порожнини, в тому числі і з позасудинною локалізацією, а саме у власній пластинці слизової і підлягаючій м'язовій пластинці, та при найбільшій активності iNOs навколо запальних клітин в товщині епітеліального пласта змінених ділянок, а як активний патологічний процес оцінюють при підвищенні активності iNOs фракції NO-синтази в 2 рази та більше у порівнянні з контрольними вимірами інтактних тканин.

Технічний ефект винаходу, а саме розширення арсеналу способів оцінки активності патологічного процесу порожнини рота при atopічній патології, обумовлений синергізмом заходів та засобів, які заявляються. Сукупність суттєвих ознак способу невідома із рівня техніки і створює зверхсумарний результат - оригінальний спосіб оцінки активності патологічного процесу порожнини рота при atopічній патології, який дозволяє досягнути підвищення точності діагностики, якої раніше неможливо було досягти. Сукупність суттєвих ознак способу, яка є невідомою із рівня техніки, володіє суттєвими відмінностями по відношенню до такої відомих способів оцінки активності патологічного процесу порожнини рота при atopічній патології та є неочевидною для фахівця. Відрізняє винахід те, що поєднане використання відомих в медицині заходів та засобів невідоме із рівня техніки і призводить до результату, який не витікає із очевидністю з відомих характеристик цих заходів та засобів, таким чином одержуючи значний зверхсумарний результат - створення нового способу оцінки активності патологічного процесу порожнини рота при atopічній патології.

Спосіб виконують наступним чином: у пацієнтів з atopічною патологією активність синтази оксиду азоту (NO-синтази) визначають в м'яких тканинах ротової порожнини за допомогою імуногістохімічного дослідження шляхом постановки непрямой імунопероксидазної реакції з моноклональними антитілами до ендотеліальної (eNOs) та індукцибельної (iNOs) фракцій NO-синтази з візуалізацією реакції за допомогою набору UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen, патологічний процес діагностують при виявленні eNOs в ендотелії змінених та незмінених ділянок слизової оболонки ротової порожнини, в тому числі і з позасудинною локалізацією, а саме у власній пластинці слизової і підлягаючій м'язовій пластинці та при найбільшій активності iNOs навколо запальних клітин в товщині епітеліального пласта змінених ділянок, а патологічний процес оцінюють як активний при підвищенні активності iNOs фракції NO-синтази в 2 рази та більше у порівнянні з контрольними вимірами інтактних тканин.

Точність та специфічність способу доведена морфологічними дослідженнями на експериментальних тваринах (самцях-кролях).

Для моделювання atopічного процесу використовували овальбумін (альбумін яєчного білка) за відомою схемою [Effect of interferon-gamma on allergic airway responses in interferon-gamma-deficient mice / M. Yoshida, R. Leigh, K. Matsumoto et al. // Am J Respir Crit Care Med.-2002. - Vol. 166. - P. 451-456; A herb extract, as the remedy for allergen-induced asthma in mice / S.J. Cho, H.W. Kim, B.Y. Kim et al. // Pulm Pharmacol Ther.-2008. - Vol. 21. - P. 578-583; Antiasthmatic effects of schizandrae fructus extract in mice with asthma / H. Kim, Y.T. Ahn, Y.S. Kim et al. // Pharmacogn Mag.-2014. - Vol. 10 (Suppl 1). - S 80-S 85]. Експериментальних тварин (самці-кролі у віці 3 місяці) сенсibiliзували шляхом внутрішньочеревної ін'єкції овальбуміну і гідроксиду алюмінію протягом перших 3-х днів експерименту. Через п'ять днів кролям під місцевою анестезією інтраназально закапували в два рази меншу дозу овальбуміну (8-й день) і повторювали інтраназальне введення овальбуміну на 16-й, 17-й, 20-й і 21-й день. Дози препаратів, які використовували, визначали у відповідності з масою тіла тварини. Були сформовані дві групи - інтактні тварини та група тварин з модельованою atopією.

Після рутинної проводки фрагменти м'яких тканин ротової порожнини забарвлювали гематоксиліном і еозином, пікрофуксином за ван Гізоном. Імуногістохімічне дослідження (ІГХ) проводили постановкою непрямой імунопероксидазної реакції з моноклональними антитілами до ендотеліальної і індукцибельної фракцій NO-синтази (eNOs і iNOs відповідно) фірми Thermo scientific. Реакцію візуалізували за допомогою набору Ultra Vision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen (Thermo scientific).

Мікропрепарати вивчали на мікроскопі "Olympus BX-41" з подальшою обробкою програмою "Olympus DP-soft version 3.2", за допомогою якої проводили визначення інтенсивності імуногістохімічних реакцій, морфометричне дослідження.

Всі процедури цього дослідження виконані відповідно до Гельсінської декларації, Європейської конвенції захисту хребетних тварин від 18.03.1986 року, директиви Ради Європейського економічного співтовариства щодо захисту хребетних тварин.

При вивченні гістологічних препаратів, забарвлених гематоксиліном і еозином, встановлено, що в результаті проведених маніпуляцій в слизовій оболонці ротової порожнини сформований комплекс патологічних змін. У епітелії відзначається нерівномірність товщини плоскоклітинного пласта з наявністю інтраепітеліальних лімфоцитів, еозинофілів, вогнищевих ерозивних ушкоджень, чергування ділянок атрофії, некрозу, проліферації. Між ділянками атрофії багат шаровий плоский епітелій нерівномірно потовщений за рахунок проліферації клітин зернистого, шипуватого і, в меншій мірі, базального шарів, з ознаками помірного папіломатозу.

У власній пластинці слизової відмічається формування периваскулярних запальних інфільтратів, дифузний розподіл еозинофілів, набухання і розволокніння сполучнотканинної основи. Мікроциркуляторне русло нерівномірного кровонаповнення.

При проведенні ІГХ імунопозитивна тканина до eNOs виявляється як в змінених, так і в незмінених ділянках слизової оболонки ротової порожнини, що абсолютно логічно пояснити наявністю судин мікроциркуляторного русла. При цьому як на поздовжніх, так і поперечних зрізах судин в обох групах тварин eNOs виявляється перш за все в ендотелії. У той же час в групі тварин з модельованою atopією імунореактивність eNOs виявляється і з позасудинною локалізацією, при цьому така картина спостерігається і у власній пластинці слизової, і підлягаючій м'язовій пластинці.

При проведенні морфометричного дослідження виявляється, що рівень активності eNOs достовірно не відрізняється в судинній стінці різних груп тварин, в той час як позасудинна локалізація eNOs достовірно вище в групі тварин з модельованою atopією (табл. 1).

Таблиця 1

Морфометричні показники активності різних фракцій синтази оксиду азоту

Групи	eNOs в стінці судин, ум. од	eNOs позасудинної локалізації, ум. од.	iNOs, ум. од
Інтактні тварини	0,87±0,06	0,17±0,04	0,24±0,05
Тварини з модельованою atopією	0,79±0,11	0,27±0,04*	0,49±0,07*

Примітка * - $p < 0,05$ в порівнянні з інтактними тваринами

При аналізі результатів пероксидазної реакції з індуцибельною фракцією NO-синтази в групі кролів з моделюванням atopії виявляється більш виражена інтенсивність, яка морфометрично підтверджується практично дворазовим зростанням (табл. 1). При цьому присутні ділянки як з дифузним посиленням імунопозитивного забарвлення тканин, так і з вогнищевим. Наявність таких зон підвищеної імунореактивності може бути пояснено імунотулюючою взаємодією даної фракції синтази оксиду азоту та запальними клітинами. На користь імунотулюючої взаємодії говорить факт найбільшої активності iNOs навколо запальних клітин в товщі епітеліального пласта.

У власній пластинці слизової найбільша активність iNOs виявляється в уражених зонах. Ступінь інтенсивності імунореактивності пов'язана з кількісним і якісним складом клітинного інфільтрату в тканинах при atopії.

Таким чином, описані морфологічні зміни в тканинах слизової оболонки ротової порожнини прийнято розглядати як прояви atopічного процесу з розвитком запальних, дистрофічних, дисциркуляторних процесів, метаболічних розладів, у розвитку яких бере активну участь порушення обміну оксиду азоту.

При atopічних процесах в ротовій порожнині морфологічна картина характеризується запальними, дистрофічними, дисциркуляторними змінами, які супроводжуються порушенням синтази оксиду азоту. Останнє характеризується підвищенням активності індуцибельної синтази оксиду азоту більш ніж в два рази, підвищенням активності ендотеліальної синтази оксиду азоту у позасудинному просторі.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб оцінки активності патологічного процесу порожнини рота, який включає визначення рівня синтази оксиду азоту в біологічних зразках, який **відрізняється** тим, що у пацієнтів з atopічною патологією активність синтази оксиду азоту (NO-синтази) визначають в м'яких тканинах ротової порожнини за допомогою імуногістохімічного дослідження шляхом постановки непрямої

імунопероксидазної реакції з моноклональними антитілами до ендотеліальної (eNOs) та індукцибельної (iNOs) фракцій NO-синтази з візуалізацією реакції за допомогою набору UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen, патологічний процес діагностують при виявленні eNOs в ендотелії змінених та незмінених ділянок слизової оболонки ротової порожнини, в тому числі і з позасудинною локалізацією, а саме у власній пластинці слизової і підлягаючій м'язовій пластинці, та при найбільшій активності iNOs навколо запальних клітин в товщині епітеліального пласта змінених ділянок, а як активний патологічний процес оцінюють при підвищенні активності iNOs фракції NO-синтази в 2 рази та більше у порівнянні з контрольними вимірами інтактних тканин.

10

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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