

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 041741

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.11.28

(21) Номер заявки
202000349

(22) Дата подачи заявки
2020.10.19

(51) Int. Cl. G01N 33/53 (2006.01)

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФОРМЫ ТЕЧЕНИЯ ПЕРИОДОНТИТА У ПАЦИЕНТА

(43) 2022.04.29

(96) 2020/ЕА/0068 (ВУ) 2020.10.19

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

КАЗЕКО ЛЮДМИЛА
АНАТОЛЬЕВНА (ВУ)

(72) Изобретатель:

Казеко Людмила Анатольевна,
Захарова Виктория Алексеевна,
Анфиногенова Елена Альфредовна,
Бенеш Юлия Дмитриевна,
Летковская Татьяна Анатольевна
(ВУ)

(74) Представитель:
Казеко Л.А. (ВУ)

(56) BY-C1-22601
EA-B1-035759

DONG W. et al., Increased expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer is associated with matrix metalloproteinase-1 and -2 in gingival tissues from patients with periodontitis, J. Periodont Res 2009; 44: 125-132. doi:10.1111/j.1600-0765.2008.01105.x - abstract, с. 126 средняя колонка третий абзац, с.126 правая колонка второй абзац, с. 127 Results правая колонка второй абзац - с. 128 левая колонка первый абзац, с. 129 правая колонка строки 1-9, с. 130 левая колонка последний абзац - средняя колонка строки 1-4, правая колонка строки 31-38, с. 128 табл. 3, с. 129 фиг. 1, с. 130 фиг. 2.

UA-U-53429
EP-A1-3407070

(57) Изобретение относится к области медицины к разделу стоматологии и позволяет определить форму течения периодонтита у пациента за счет исследования биоптата десны иммуногистохимическим методом, когда при определении выраженной экспрессии матриксной металлопротеиназы-1 судят о наличии быстро прогрессирующей формы течения периодонтита, а при слабой и умеренной экспрессии судят о наличии хронической формы течения периодонтита.

041741

B1

041741
B1

Изобретение относится к области медицины, а именно к стоматологии, и может быть использовано для диагностики заболеваний периодонта на основе иммуногистохимического исследования биоптата десны.

Заявителю известен способ определения характера течения периодонтита на основе иммуногистохимического анализа биоптатов десны, заключающийся в определении уровня экспрессии матриксной металлопротеиназы-13 в биоптатах десны, когда при определении слабой экспрессии судят о наличии быстро прогрессирующего характера течения периодонтита, а при умеренной и высокой - о наличии хронического периодонтита. Описанный способ является способом-аналогом [1].

Общим признаком для заявляемого способа и способа-аналога является изучение биоптатов десны с помощью иммуногистохимического анализа, заключающееся в определении интенсивности экспрессии матриксных металлопротеиназ.

Однако использование способа-аналога не всегда позволяет определить характер течения периодонтита, так как экспрессия ММП-13 зависит от ММП-14, которая активизирует ММП-13 путем деградации коллагенов I, II, III и активации ее профермента. [2] Особенность экспрессии ММП-13 при быстро прогрессирующем течении периодонтита заключается в малой площади стромальной экспрессии данного маркера, не превышающей 25% при умеренной интенсивности в иммунопозитивных участках. Поэтому обнаружение в биоптатах десны и использование ММП-13 как диагностического маркера уместно только на этапе манифестации заболевания.

Заявителю также известен способ определения формы течения периодонтита у пациента путем иммуногистохимического исследования биоптата десны, заключающийся в определении интенсивности экспрессии в биоптате десны пациента с периодонтитом матриксной металлопротеиназы-14, когда при выявлении слабой или умеренной интенсивности экспрессии матриксной металлопротеиназы-14 судят о быстро прогрессирующем течении периодонтита, а при выявлении выраженной интенсивности экспрессии матриксной металлопротеиназы-14 судят о хроническом течении периодонтита. [3] Указанный способ является прототипом по отношению к заявляемому.

Общим признаком для заявляемого способа и способа-прототипа является изучение биоптатов десны с помощью иммуногистохимического анализа для определения интенсивности экспрессии матриксных металлопротеиназ.

Однако ММП-14 является мембраносвязанным ферментом и характеризуется мембранным паттерном окрашивания клеток базального слоя эпителия и клеток стромы, следовательно, экспрессия ММП-14 носит преимущественно слабый и умеренно выраженный характер в биоптатах десны с положительным результатом окрашивания. Отсутствие выраженного окрашивания может повлечь за собой возможные диагностические ошибки в визуальной оценке биоптатов. Поэтому использование секретируемых (свободных) ММП для иммуногистохимического анализа позволит повысить точность исследования. К таким относится матриксная металлопротеиназа-1.

Задачей заявляемого способа является повышение точности определения формы течения периодонтита у пациента путем использования секретируемой матриксной металлопротеиназы-1 при иммуногистохимическом исследовании биоптата десны.

Поставленная задача достигается следующим образом.

Предложен способ определения формы течения периодонтита у пациента путем иммуногистохимического исследования биоптата десны и последующего определения интенсивности экспрессии матриксной металлопротеиназы-1, когда при определении выраженной экспрессии судят о наличии быстро прогрессирующей формы течения периодонтита, а при определении слабой и умеренной экспрессии судят о наличии хронического периодонтита.

Заявителем на основании проведенных исследований 30 пациентов, которые имели быстро прогрессирующий и хронический периодонтит, было выявлено, что этот процесс связан с участием матриксной металлопротеиназы-1 в ремоделировании внеклеточного матрикса периодонта, т.е. в адаптации соединительной ткани периодонта к воспалению. Было установлено, что быстро прогрессирующий периодонтит характеризуется повышенной экспрессией матриксной металлопротеиназы-1.

Проанализирован биопсийный материал 30 пациентов с признаками быстро прогрессирующего (n=6), хронического простого (n=7) и хронического сложного (n=17) периодонтитов. Морфологическое исследование включало оценку наблюдений групп патологии периодонта при стандартном окрашивании патогистологических препаратов гематоксилином и эозином и с использованием иммуногистохимического (ИГХ) метода с моноклональными антителами к ММП-1.

Отработка протокола ИГХ окрашивания включала подбор оптимального режима демаскировки антигена (2' в буфере pH 9,0 при температуре 125°C в нагреваемой барокамере Pascal), разведения первичных моноклональных антител к ММП-1 (1:100), визуализирующей системы, времени экспозиции хромогена 7'. В качестве хромогена использовали диаминобензидин (ДАКО, Дания), контрокрашивание - гематоксилином Майера. Позитивным контролем являлись ткани и органы, рекомендованные производителем, негативным - исключение первичного антитела.

Для морфометрического анализа выполняли сканирование препаратов, окрашенных с использованием иммуногистохимического метода, с применением цифрового слайд-сканера MoticEasyScan с последующим

программным анализом изображений с использованием AperioImageScopev1 2.4.0.5043. В рамках программного анализа изображений проводилось выделение 4-6 случайных непересекающихся полей зрения (цифровое увеличение x8), с анализом ИГХ окрашивания в поле зрения в целом (которое включало эпителиальный и стромальный компонент в равных пропорциях), а также отдельно в стромальном компоненте десны. В процессе программного анализа экспрессии ММП-1 в ткани десны интенсивность ИГХ окраски измерялась AperioImageScope автоматически и разделялась на 4 уровня интенсивности: 0-100 (выраженная, соответствующая очагам красного цвета), 101-175 (умеренная, с программным окрашиванием соответствующих участков в оранжевый цвет), 176-220 (слабовыраженная, соответствующая участкам желтого цвета) и более 220 (негативная реакция, визуализируемая в виде участков синего цвета) (фиг. 1), где: 1 - результат окрашивания эпителия, 2- результат окрашивания стромы, 3 - результат преобразования изображения в программе AperioImageScope (эпителий), 4 - результат преобразования изображения в программе AperioImageScope (строма).

Экспрессия ММП-1 в группах пациентов с различными формами периодонтитов выявлялась в виде мембранного и цитоплазматического окрашивания эпителиальных клеток, клеток воспалительного инфильтрата, фибробластов и эндотелиальных клеток собственной пластинки десны.

При визуальной оценке гистологических препаратов экспрессия ММП-1 в группе быстропрогрессирующего периодонтита характеризовалась более выраженным окрашиванием стромального компонента десны по сравнению с группами хронического простого и сложного периодонтитов с преобладанием экспрессии в клетках воспалительного инфильтрата, фибробластах и эндотелии собственной пластинки десны (фиг. 2), где 5 - эпителий с умеренной и высокой степенью экспрессии; 6 - строма с умеренной степенью экспрессии; 7 - эпителий с умеренной и высокой степенью экспрессии (результат преобразования изображения в программе AperioImageScope); 8 - строма с умеренной степенью экспрессии (результат преобразования изображения в программе

AperioImageScope). Такое окрашивание свидетельствует о наличии быстропрогрессирующего периодонтита.

На фиг. 3 и 4 представлено иммуногистохимическое окрашивание гистологического препарата пациента с хроническим течением периодонтита (хронический простой и хронический сложный периодонтит соответственно) с антителами к матриксной металлопротеиназе-1, где 9 - слабая экспрессия в эпителии при хроническом простом периодонтите; 10 - строма со слабой степенью экспрессии; 11 - слабая экспрессия в эпителии при хроническом простом периодонтите (результат преобразования изображения в программе AperioImageScope); 12 - строма со слабой степенью экспрессии (результат преобразования изображения в программе AperioImageScope); 13 - слабая экспрессия в эпителии при хроническом сложном периодонтите; 14 - слабая экспрессия в строме, 15 - слабая экспрессия в эпителии при хроническом сложном периодонтите (результат преобразования изображения в программе AperioImageScope); 16 - слабая экспрессия в строме (результат преобразования изображения в программе AperioImageScope). Такое окрашивание свидетельствует о наличии хронического периодонтита.

Пример 1.

Способ осуществляется следующим способом.

Пациент Д., 30 лет, обратился с жалобами на выявленную подвижность зубов. Был установлен предварительный диагноз быстропрогрессирующий периодонтит. Для выбора правильной тактики лечения необходимо верифицировать диагноз, т.е. определить форму течения периодонтита у данного пациента. Для этого у пациента берут биоптат десны и проводят стандартное иммуногистохимическое исследование на предмет определения интенсивности экспрессии матриксной металлопротеиназы-1. Данный фермент расщепляет коллагены I, II, III, VII, VIII, X типа, желатин, казеин, агрекан, внутриклеточные протеины, также может активировать другие металлопротеиназы, например -2 и -9, инициируя каскад активации.

По стандартной методике [5] производят окрашивание, сканирование препаратов с применением цифрового слайд-сканера MoticEasyScan, выделение 4-6 случайных непересекающихся полей зрения (цифровое увеличение x8) с последующим морфометрическим анализом изображений с использованием AperioImageScopev1 2.4.0.5043. На фиг. 2 представлены полученные результаты, из которых по интенсивному окрашиванию видно, что у пациента быстропрогрессирующее течение периодонтита. На основании полученных данных лечащий врач имеет возможность выбрать наиболее оптимальную тактику лечения.

Пример 2.

Пациент С, 45 лет, обратился с жалобами на выявленную подвижность зубов. Был установлен предварительный диагноз хронический периодонтит. Для выбора правильной тактики лечения необходимо верифицировать диагноз, т.е. определить форму течения периодонтита у данного пациента. Аналогичным образом, как описано в примере 1, у пациента берут биоптат десны и проводят стандартное иммуногистохимическое исследование на предмет определения интенсивности экспрессии матриксной металлопротеиназы-1. На фиг. 3 и 4 представлены полученные результаты, из которых по слабому окрашиванию стромы видно, что у пациента хроническое течение периодонтита. На основании полученных данных лечащий врач принимает наиболее оптимальную тактику лечения пациента.

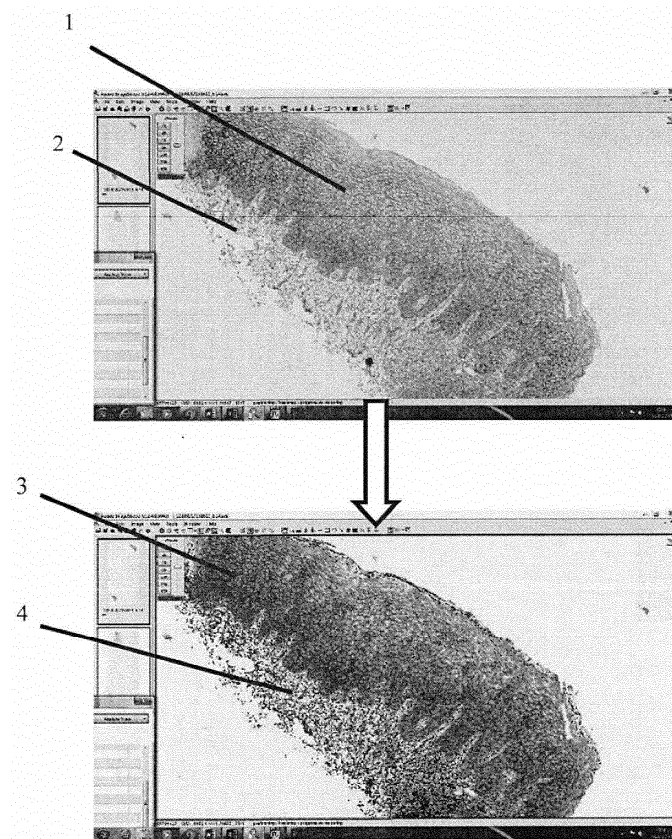
Таким образом, достигаемый технический результат заявляемого способа заключается в том, что предложенная методика позволяет установить диагноз быстро прогрессирующего периодонтита, провести дифференциальную диагностику характера течения периодонтита у пациента, а также способ может быть использован в качестве инструмента для ранней и доклинической диагностики быстро прогрессирующего периодонтита, что позволит повысить уровень оказания стоматологической помощи данной группе пациентов.

Литература.

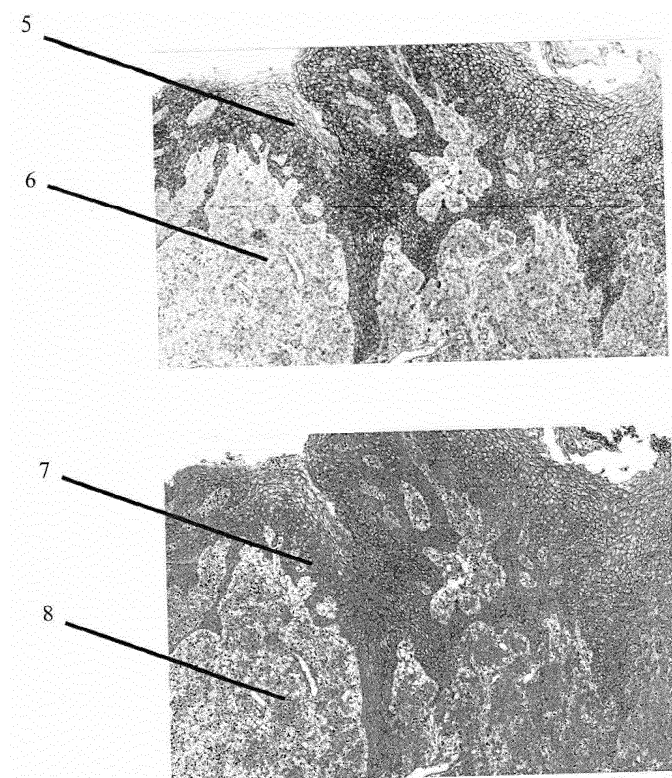
- 1) Способ определения формы течения периодонтита у пациента/Казеко Л. А., Колб Е. Л., Рукша К. Г., Портянко А. С., Черствый Е. Д.//Официальный бюллетень "Изобретения. Полезные модели. Промышленные образцы. Топологии интегральных микросхем". -№ 1. -2020. -С. 45.
2. Dahan, M. Expression of matrix metalloproteinases in healthy and diseased human gingiva/M. Dahan [et al.]/J. Clin. Periodontol. 2001. Vol. 28.P. 128-136.
3. Способ определения течения периодонтита у пациента /Казеко Л. А., Рукша К. Г., Портянко А. С., Черствый Е. Д.//Официальный бюллетень "Изобретения. Полезные модели. Промышленные образцы. Топологии интегральных микросхем". -№ 3. -2019. -С. 63.
4. Роль матричной металлопротеиназы 1 в прогнозировании течения патологии периодонта/Казеко Л.А., Захарова В.А., Анфиногенова Е.А., Черствый Е.Д.//Современная стоматология. -№2. -2020. -С. 83-88.
5. Taylor C.R., Shi S.R., Barr N.J. Techniques of immunohistochemistry: principles; pitfalls and standardization//Diagnostic Immunohistochemistry: theranostic and genomic applications/[edited by] David J. Dabbs. 2010 3d ed.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

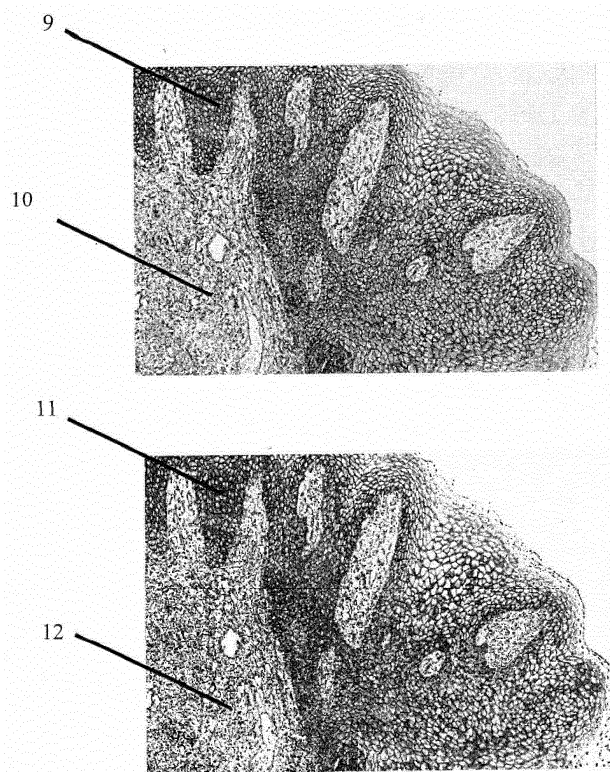
Способ определения формы течения периодонтита у пациента путем иммуногистохимического исследования биоптата десны и последующего определения интенсивности экспрессии матричной металлопротеиназы-1 (ММП-1), для этого на цифровом слайд-сканере выполняют сканирование окрашенных препаратов и преобразовывают отсканированное изображение в программе AperioImageScore, при анализе полученных изображений выделяют 4-6 случайных непересекающихся полей зрения, в каждом из которых анализируют окрашивание в поле зрения в целом и отдельно в стромальном компоненте десны, где интенсивность иммуногистохимической окраски автоматически измеряется и разделяется на выраженную экспрессию ММП-1, которая соответствует окрашиванию участков препарата в поле зрения в красный цвет, на умеренную экспрессию ММП-1, которая соответствует окрашиванию участков препарата в поле зрения в оранжевый цвет, на слабовыраженную экспрессию ММП-1, которая соответствует окрашиванию участков препарата в поле зрения в желтый цвет, затем по выраженной экспрессии ММП-1 судят о наличии быстро прогрессирующей формы течения периодонтита, а при определении слабовыраженной и умеренной экспрессии ММП-1 судят о наличии хронического течения периодонтита.



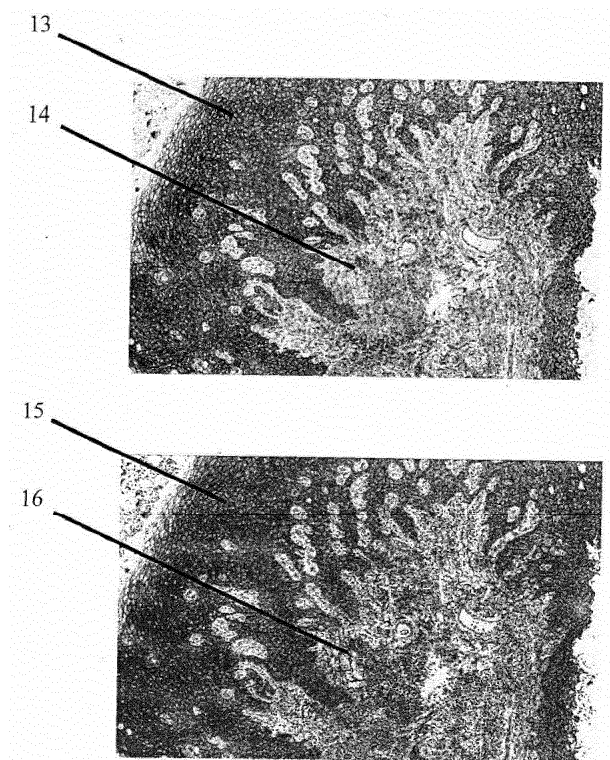
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

