

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044139**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.07.26

(51) Int. Cl. **G01N 33/573 (2006.01)**

(21) Номер заявки
202291874

(22) Дата подачи заявки
2022.06.01

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЯЖЕСТИ ВОСПАЛИТЕЛЬНО-ДЕСТРУКТИВНОГО ПРОЦЕССА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ ТЕЧЕНИЯ ПЕРИОДОНТИТА У ПАЦИЕНТА

(43) **2023.07.25**

(56) RU-C1-2617291

(96) **2022/EA/0030 (BY) 2022.06.01**

КАЗЕКО Л.А. и др. Экспрессия тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ-2 при патологии периодонта// Современные технологии в медицинском образовании: материалы междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 100-летию Белорус. гос. мед. ун-та. - Минск, 2021, с. 1239-1242, с. 241, абзац 4, результаты

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**КАЗЕКО ЛЮДМИЛА
АНАТОЛЬЕВНА (BY)**

RU-C1-2307592

(72) Изобретатель:
**Казеко Людмила Анатольевна,
Захарова Виктория Алексеевна,
Бенеш Юлия Дмитриевна (BY)**

RU-C1-2648765

US-A1-20210223234

OYARZUN A. et al. Involvement of MT I-MMP and TIMP-2 in human periodontal disease. Oral Diseases, 2010, 16(4), p. 388-395, doi:10.1111/j.1601-0825.2009.01651.x

SHIN Dong-Seok et al. The expressions of inflammatory factors and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 in human chronic periodontitis with type 2 diabetes mellitus. J Periodontal Implant Sci, 2010, 40(1), p. 33-38, doi: 10.5051/jpis.2010.40.1.33

(57) Изобретение относится к области медицины к разделу стоматологии и позволяет определить тяжесть течения периодонтита у пациента за счет исследования биоптата десны иммуногистохимическим методом, когда при определении слабой и умеренной экспрессии тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ-2 (со значениями от 101 до 220) судят о высоком воспалительно-деструктивном потенциале, а при выраженной экспрессии (со значениями от 0 до 100) судят о наличии низкого воспалительно-деструктивного потенциала при периодонтите.

B1

044139

**044139
B1**

Изобретение относится к области медицины, а именно к стоматологии, и может быть использовано для ранней 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 ферментов, регулирующих процессы деструкции в экстрацеллюлярном матриксе тканей периодонта.

Заявителю также известен способ определения формы течения периодонтита у пациента путем иммуногистохимического исследования биоптата десны, заключающийся в определении интенсивности экспрессии матриксной металлопротеиназы-14 в биоптате десны пациента с периодонтитом, 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 его течении [2]. Указанный способ является аналогом по отношению к заявляемому.

Общим признаком для заявляемого способа и способа-аналога является изучение биоптатов десны с помощью иммуногистохимического анализа, заключающееся в определении интенсивности экспрессии ферментов, регулирующих процессы деструкции в экстрацеллюлярном матриксе тканей периодонта.

Однако использование способа-аналога позволяет определить только характер течения периодонтита, так как оценка экспрессии матриксных металлопротеиназ позволяет дифференцировать формы периодонтита по скорости течения процесса, но не позволяет оценить деструктивный потенциал заболевания. При хроническом сложном периодонтите на этапе манифестации заболевания уровень деструкции костной ткани сопоставим с деструкцией при быстро прогрессирующем периодонтите, и критериями для дифференциальной диагностики служат клинические данные, паттерн деструкции альвеолярного отростка, возраст пациента и уровни экспрессии матриксных металлопротеиназ. На раннем клиническом этапе клиническая картина схожа при всех формах течения периодонтита, что затрудняет дифференциальную диагностику и прогнозирование течения процесса. Так, оценка экспрессии ММП позволяет прогнозировать скорость, с которой будет развиваться периодонтит, тогда как экспрессия ТИМП-2 может быть использована как маркер тяжести воспалительно-деструктивного процесса.

В здоровых тканях периодонта уровни ТИМП обычно выше, чем при воспалительно-деструктивных процессах. При выраженных клинических признаках периодонтита концентрация активных ММП высокая. В десневой жидкости и в собственных тканях десны уровни ММП-1, 2, 3 и 9 значительно повышены, тогда как ТИМП-1 и 2 значительно снижены [3]. Бактериальное воспаление ведет к каскаду экспрессии и активации ММП различными типами клеток, что способствует деградации внеклеточного матрикса. Считается, что дисбаланс между ММП и ТИМП вызывает деградацию внеклеточного матрикса, базальной мембраны и альвеолярной кости, и, таким образом, инициирует болезни периодонта [4]. Хотя основной функцией ТИМП является ингибирование ММП, они могут принимать участие в транспортировке и стабилизации ММП. Увеличение экспрессии ММП и снижение уровней ТИМП инициируют деградацию коллагена в соединительной ткани и альвеолярной кости. Возможно, избыточное количество продуктов распада коллагена в десневой жидкости и слюне может быть использовано для прогнозирования потери альвеолярной кости при периодонтите [4]. В некоторых случаях появление ММП и ТИМП в биологических жидкостях, таких как слюна, десневая жидкость или сыворотка крови, дает дополнительную информацию о прогрессировании заболевания.

Задачами заявляемого изобретения являются создание способа определения степени тяжести воспалительно-деструктивного процесса у пациентов с различной формой течения периодонтита путём иммуногистохимического исследования биоптата десны с последующей количественной оценкой экспрессии ТИМП-2, и, таким образом, повышение точности прогноза заболевания.

Поставленная задача достигается следующим образом.

Предложен способ определения тяжести периодонтита у пациента, заключающийся в том, что в биоптате десны иммуногистохимическим методом определяют интенсивность экспрессии тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ-2 и при выявлении слабой и умеренной интенсивности экспрессии судят о выраженном воспалительно-деструктивном потенциале (наблюдаемом при быстро прогрессирующем и хроническом сложном периодонтите), а при выявлении высокой интенсивности экспрессии тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ-2 - о медленно протекающем процессе с низким воспалительно-деструктивным потенциалом (хроническом простом периодонтите).

Заявителем на основании проведенных клинических наблюдений 67 пациентов с быстро прогрессирующим и хроническим (сложным и простым) периодонтитом было выявлено, что этот процесс связан с дисбалансом в системе ММП-ТИМП, которая отвечает за ремоделирование внеклеточного матрикса, то есть адаптацию соединительной ткани десны к воспалению. Было установлено, что площадь и интенсив-

ность экспрессии тканевого ингибитора матричных металлопротеиназ-2 была наименьшей в группе контроля и значительно повышалась в направлении ХСП, БПП, с наибольшими параметрами при ХПП.

Обследовано 67 пациентов, из которых у 19 был выявлен быстро прогрессирующий периодонтит, у 10 - хронический простой периодонтит, у 38 - хронический сложный периодонтит. У пациентов с хроническим простым периодонтитом экспрессия тканевого ингибитора матричных металлопротеиназ-2 была выраженная, у пациентов с быстро прогрессирующим и хроническим сложным периодонтитом - слабая и умеренная. Выраженная экспрессия в периодонте характеризуется интенсивным иммуногистохимическим окрашиванием стромального компартмента. Слабая и умеренная экспрессия характеризуется меньшей площадью окрашивания поля зрения исследуемой ткани, нежели при выраженной экспрессии, а также значительно меньшей интенсивностью окраски. Это различие дает возможность исследователю определить воспалительно-деструктивный потенциал периодонтита у пациента.

В процессе программного анализа экспрессии ТИМП-2 в ткани десны интенсивность ИГХ окраски измерялась AperioImageScore 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).

Заявляемый способ иллюстрируется фигурами 1-3, где на фиг. 1 представлено иммуногистохимическое окрашивание с антителами к тканевому ингибитору матричных металлопротеиназ-2, морфометрический анализ проведен с помощью программы Aperio Image Score v 9.0, x20: (хромоген - диаминобензидин), где 1 - эпителий с умеренной степенью экспрессии; 2 - строма с умеренной степенью экспрессии; 3 - эпителий с умеренной степенью экспрессии (результат преобразования изображения в программе AperioImageScore); 4 - строма с умеренной степенью экспрессии (результат преобразования изображения в программе AperioImageScore). Такое окрашивание свидетельствует о наличии быстро прогрессирующего периодонтита.

На фиг. 2 представлено иммуногистохимическое окрашивание с антителами к тканевому ингибитору матричных металлопротеиназ-2, x20, где 5 - эпителий с умеренной степенью экспрессии; 6 - строма с умеренной степенью экспрессии; 7 - эпителий с умеренной степенью экспрессии (результат преобразования изображения в программе AperioImageScore); 8 - строма с умеренной степенью экспрессии (результат преобразования изображения в программе AperioImageScore). Такое окрашивание свидетельствует о наличии хронического сложного периодонтита.

На фиг. 3 представлено изображение морфометрического анализа микрофотографии иммуногистохимического окрашивания с помощью программы Aperio Image Score v 9.0, где 9 - эпителий с высокой степенью экспрессии; 10 - строма с высокой степенью экспрессии; 11 - эпителий с высокой степенью экспрессии (результат преобразования изображения в программе AperioImageScore); 12 - строма с высокой степенью экспрессии (результат преобразования изображения в программе AperioImageScore). Такое окрашивание свидетельствует о наличии хронического простого периодонтита.

Пример 1.

Способ осуществляется следующим образом.

Пациент Д., 30 лет, обратился с жалобами на выявленную подвижность зубов. Был установлен предварительный диагноз быстро прогрессирующий периодонтит. Для выбора правильной тактики лечения необходимо верифицировать диагноз (определить экспрессию ММП) и спрогнозировать тяжесть развития процесса у данного пациента (определить экспрессию ТИМП). Для этого у пациента берут биоптат десны и проводят стандартное иммуногистохимическое исследование на предмет определения интенсивности экспрессии тканевого ингибитора матричных металлопротеиназ-2.

По стандартной методике [1] производят окрашивание и морфологическое исследование срезов с последующим получением электронных микрофотографий (увеличение x20) (фиг. 1). После этого осуществляют морфометрическое исследование в программе Aperio Image Score v 9.0 с использованием алгоритма Pixel Counter. На фиг. 1 представлены полученные результаты, из которых по слабому и умеренному окрашиванию стромы (2) видно, что у пациента быстро прогрессирующий периодонтит с выраженным деструктивным потенциалом. 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 (определить экспрессию ММП), и определить тяжесть течения периодонтита у данного пациента (определить экспрессию ТИМП). Аналогичным образом, как описано в примере 1, у пациента берут биоптат десны и проводят стандартное иммуногистохимическое исследование на предмет определения интенсивности экспрессии тканевого ингибитора матричных металлопротеиназ-2. На фиг. 2 представлены полученные результаты, из которых по слабому и умеренному окрашиванию стромы (6) видно, что у пациента хронический сложный периодонтит. На основании полученных данных лечащий врач имеет возможность выбрать наиболее оптимальную тактику лечения.

Пример 3.

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 (определить экспрессию ММП), и определить тяжесть течения периодонтита у данного пациента (определить экспрессию ТИМП). Аналогичным образом, как описано в примере 1, у пациента берут биоптат десны и проводят стандартное иммуногистохимическое исследование на предмет определения интенсивности экспрессии тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ-2. На фиг. 3 представлены полученные результаты, из которых по выраженному окрашиванию стромы (10) видно, что у пациента хронический простой периодонтит. На основании полученных данных лечащий врач имеет возможность выбрать наиболее оптимальную тактику лечения.

Таким образом, достигаемый технический результат заявляемого способа заключается в том, что предложенный алгоритм определения тяжести воспалительно-деструктивного потенциала у пациента позволяет на ранних стадиях развития выявить группы пациентов с тяжелым течением периодонтита, что, в свою очередь, даст возможность осуществить своевременное и правильное лечение указанного заболевания.

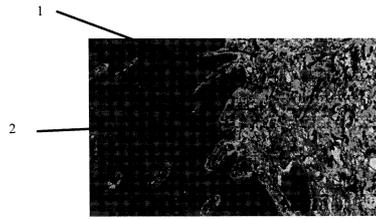
Таким образом, оценивая характер экспрессии тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ на ранних клинических этапах можно прогнозировать течение периодонтита.

Литература.

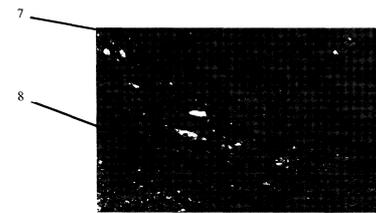
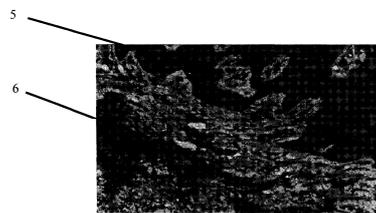
1. Способ определения формы течения периодонтита у пациента /Казеко Л. А., Колб Е. Л., Рукша К. Г., Портянко А. С., Черствый Е. Д.// Официальный бюллетень «Изобретения. Полезные модели. Промышленные образцы. Топологии интегральных микросхем» № 1. – 2020. С. 45.
2. Способ определения течения периодонтита 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.
3. Soell M., Elkaim R., Tenenbaum H., Cathepsin C. Matrix metalloproteinases, and their tissue inhibitors in gingiva and gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. J. Dent. Res., 2002, vol. 81, no. 3, pp.174-178.
4. Sorsa T., Tjaderhane L., Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. Oral Dis., 2004, vol.10, no. 6, pp.311-318.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ определения тяжести воспалительно-деструктивного процесса у пациентов с различной формой течения периодонтита путём иммуногистохимического исследования биоптата десны и последующего определения интенсивности экспрессии тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ-2, когда при определении слабой и умеренной экспрессии тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ-2 со значениями от 101 до 220 судят о высоком воспалительно-деструктивном потенциале течения периодонтита, а при выраженной экспрессии со значениями от 0 до 100 судят о наличии низкого воспалительно-деструктивного потенциала течения периодонтита.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3