

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391460** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.02.16

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

(22) Дата подачи заявки
2023.05.10

(54) **СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ХРОНИЗАЦИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА
СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА У ДЕТЕЙ СО СТОМАТИТОМ**

(96) **2023/ЕА/0021 (ВУ) 2023.05.10**

(72) Изобретатель:

(71) Заявитель:
**УЧРЕЖДЕНИЕ
ОБРАЗОВАНИЯ "ВИТЕБСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ОРДЕНА ДРУЖБЫ
НАРОДОВ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ" (ВУ)**

**Кузьменкова Ангелина
Владимировна, Асирян Елена
Геннадьевна, Костюкович Анастасия
Алексеевна (ВУ)**

(57) Изобретение относится к медицине, в частности к стоматологии, клинической иммунологии, педиатрии, и может быть использовано для выявления диагностического маркера хронизации стоматита у пациентов детского возраста. Сущность способа заключается в том, что определяют уровень миелопероксидазы в нестимулированной ротовой жидкости, и при значении 198,08 U/L и более у детей 4-7 лет в первичном периоде формирования слизистой, а у детей 8-12 лет во вторичном периоде формирования слизистой при значении 217,5 U/L и более диагностируют хронизацию стоматита. Положительный эффект предлагаемого изобретения заключается в том, что предложенный способ обладает высокой диагностической чувствительностью и специфичностью и позволяет определить хронизацию стоматита детского возраста в различные периоды формирования слизистой оболочки полости рта.

A1

202391460

202391460

A1

Объект: способ
МПК: A61B 10/00
G01N 33/48
G01N 33/573

СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ХРОНИЗАЦИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА У ДЕТЕЙ СО СТОМАТИТОМ

Изобретение относится к медицине, в частности к стоматологии, клинической иммунологии, педиатрии, и может быть использовано для выявления диагностического маркера хронизации стоматита у пациентов детского возраста.

Защиту организма от воздействия микробных патогенов, токсинов, инородных частиц, опухолевых клеток и аутоиммунных процессов обеспечивает система иммунитета, являющаяся неотъемлемой частью организма. Корректное функционирование и представление собой защитного барьера от вторжения вредных агентов способствует поддержанию биологического равновесия. Кроме того, на молекулярном уровне система иммунитета должна быть способна дифференцировать свое и чужое, сохраняя индивидуальность организма [1].

Иммунологический статус полости рта опосредован как врожденными, так и приобретенными свойствами [2]. Врожденный иммунитет в полости рта обеспечивает замедление и приостановление процессов жизнедеятельности микроорганизмов. Неповрежденная слизистая оболочка выступает механическим барьером, который большинство микроорганизмов не способны преодолеть [2].

Механическое очищение слизистой оболочки полости рта от микроорганизмов происходит в момент принятия пищи и жидкости [3].

Нормальная микрофлора или аутофлора является важнейшим защитным компонентом полости рта. Многочисленные представители аутофлоры, такие как стрептококки и лактобациллы, благодаря молочной

кислоте, выработанной в избытке, оказывают выраженное антагонистическое действие на патогенные и условно-патогенные микроорганизмы [3].

Фундаментальным фактором защиты в ротовой полости является миелопероксидаза (МПО), являющаяся важной составной частью антимикробной активности фагоцитов, обеспечивающей врожденный неспецифический иммунитет.

Основной функцией МПО в организме является защита от внешней инфекции, однако при ряде условий она может вызывать повреждение собственных тканей организма в очагах воспаления. Как показатель активности нейтрофилов, МПО может служить маркером интенсивности воспалительных процессов [3].

Существует радиометрический метод определения бактерицидной активности по высвобождению Cr^{51} из Cr^{51} -меченных бактерий. К недостаткам данного метода можно отнести трудоемкость данного метода, наличие специализированных условий и разрешения к работе с радиоактивными препаратами [4].

Известен способ оценки популяционного состава иммунных клеток слюны с помощью проточной цитофлюорометрии, данный способ позволяет проводить анализ популяционного состава клеток образца слюны, выделяя жизнеспособные лейкоциты с помощью двух маркеров CD45 и 7-AAD, однако в данном способе не отражены показатели хронического стоматита [5]. Данный способ используется для диагностики иммунодефицитных состояний, достаточно трудоемкий, дорогостоящий, нет дифференцировки между возрастными пациентами и детьми, что необходимо учитывать, основываясь на возрастных особенностях формирования иммунитета.

Также известен способ прогнозирования рецидива хронического афтозного стоматита, в основе которого лежит цитологический анализ образца тканей с последующим изучением индекса дифференцировки клеток эпителия [5].

Известен метод диагностики уровня миелопероксидазы в ротовой жидкости у пациентов с одонтогенными флегмонами. Для постановки метода использовался 0,1 мМ хромогенный субстрат 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) и гидропирит как источник 0,05 мМ перекиси водорода. При содержании МПО в ротовой жидкости у пациентов с одонтогенными флегмонами, равное в день госпитализации более 10,69 ед., позволяет предположить, что длительность пребывания пациента в стационаре составит более 10 дней, при этом диагностическая эффективность составляет 95,9% [6]. Недостатком данного метода является использование только для определенной нозологической формы.

Существует метод диагностики воспалительных процессов полости рта по уровню цитокинов ФНО-альфа и ИЛ-8, который осуществляется путем забора слюны, ее центрифугированием, отделением надосадочной жидкости. При этом в надосадочной жидкости путем иммуноферментного анализа определяют уровни цитокинов ФНО-альфа и ИЛ-8. При значениях ФНО-альфа от 0,4 до 1,2 пг/мл и ИЛ-8 от 84,5 до 110,5 пг/мл диагностируют воспалительный процесс полости рта [7]. Недостатками способа являются то, что не учитывается сопутствующая патология, которая может влиять на уровень цитокинов в слюне.

Известен способ оценки состояния местного иммунитета в полости рта путем определения коэффициента сбалансированности факторов местного иммунитета (Ксб), расчет которого проводился по формуле (по методике Н.И.Толмачевой, 1987, в модификации Л.М.Лукиных, 2001): $Kc\text{б} = 40 / (SIgA \times Liz)$, где 40 - условная норма активности лизоцима, SIgA - содержание секреторного иммуноглобулина А (г/л), Liz - процент активности лизоцима. Кс б в пределах 0,1-1,0 указывает на отсутствие дисбаланса в содержании указанных факторов; 1,1-2,0 - на пограничное состояние, 2,1 и выше - на снижение защитной функции ротовой жидкости вследствие уменьшения содержания и/или активности факторов местной защиты [8]. Однако этот метод сбора материала для исследования не позволяет оценить

степень грубых нарушений гомеостаза, так как после полоскания из полости рта удаляется большее количество клеток слущенного эпителия, изменяется концентрация факторов местного иммунитета, которые были достигнуты в полости рта в течение последних 8- 10 часов.

Ближайшим аналогом является метод, заключающийся в оценке мукозального иммунитета при хроническом рецидивирующем афтозном стоматите, включающий определение бактерицидной активности слюны (БАС) методом проточной цитофлуорометрии, а также определение активности лизоцима. В данном методе при значениях БАС равных 65,7 % и выше прогнозируется течение заболевания благоприятное, а при величине БАС равной 37,0 % и ниже – как течение, осложненное эрозиями слизистой оболочки полости рта [9]. Данный способ достаточно трудоемкий и дорогостоящий.

Задачей предполагаемого изобретения является разработка способа диагностики хронизации воспалительного процесса слизистой оболочки полости рта у пациентов детского возраста с хроническим стоматитом с целью последующего выбора вторичной медицинской профилактики и тактики лечения.

Реализация данной задачи достигается за счет того, что определяют уровень миелопероксидазы в нестимулированной ротовой жидкости, и при значении 198,08 U/L и более у детей 4-7 лет в первичном периоде формирования слизистой, а у детей 8-12 лет во вторичном периоде формирования слизистой при значении 217,5 U/L и более диагностируют хронизацию стоматита.

Способ осуществляется следующим образом:

- 1) Осуществляют забор слюны у пациентов детского в возрасте от четырех до семнадцати лет с диагнозом хронический стоматит при первичной консультации натощак без стимулирования выделения в течение 5-15 минут.

- 2) Производят центрифугирование слюны на 5000 оборотах в течение

10 минут.

3) Определяют уровень МПО в U/L методом биохимического анализа с помощью набора Elabscience «Myeloperoxidase (MPO) Activity» Biochemical Assay Kit.

Подверженность детей к развитию стоматитов различной этиологии объясняется постепенным физиологическим формированием гистологических структур слизистой оболочки полости рта. С учетом этих особенностей наблюдается постепенное становление и иммунологических структур, как специфического, так и неспецифического местного иммунитета.

Апробация метода проведена на 120 пациентах в возрасте от четырех до семнадцати лет. Все дети были разделены на 4 группы: группа А (n=30) – дети в возрасте от 4 до 7 лет с диагнозом хронический стоматит. Группа В (n=30) – дети в возрасте от 8 до 12 лет с диагнозом хронический стоматит. Группа С (n=30) – здоровые дети в возрасте от 4 до 7 лет (без заболеваний слизистой оболочки полости рта в анамнезе). Группа D (n=30) – здоровые дети в возрасте от 8 до 12 лет (без заболеваний слизистой оболочки полости рта в анамнезе).

Оценку МПО у детей проводили методом биохимического анализа, определяя в ротовой жидкости концентрацию МПО (таблица 1).

Таблица 1 - Уровень миелопероксидазы в слюне в исследуемых группах

Показатели	Единицы измерения	Me [LQ-UQ]	
		Группа А (n=30)	Группа С (n=30)
Миелопероксидаза	U/L	361,20 [330,14-625,31]	198,08 [170,89-302,94]
Показатели	Единицы измерения	Группа В (n=30)	Группа D (n=30)
Миелопероксидаза	U/L	431,11 [334,02-481,61]	194,19 [77,68-217,5]

В период первичного формирования слизистой оболочки полости рта (4-7 лет) концентрация МПО составила 361,20 U/L [330,14-625,31], что статистически значимо выше, чем в группе контроля С 198,08 U/L [170,89-302,94] ($p < 0,03$). Показатели МПО у детей в период вторичного формирования слизистой (8-12 лет) составили 431,11 U/L [334,02-481,61], что

достоверно выше в сравнении с группой контроля D, где этот показатель равен 194,19 U/L [77,68-217,5] ($p < 0,03$).

Провели оценку информационной значимости пороговых величин, изучаемого уровня МПО у детей с хроническим стоматитом. С целью выявления диагностических критериев хронизации заболевания использовали ROC-анализ (Receiver Operator Characteristic) с построением характеристических кривых зависимости чувствительности значений величины от вероятности ложноположительных результатов и измерения площади под кривыми. Для определения прогностической силы предлагаемого метода вычисляли показатель площади AUC (Area Under Curve) под кривой. Качество модели считали отличным при $AUC = 0,9-1,0$; очень хорошим – $AUC = 0,8-0,9$; хорошим – $AUC = 0,7-0,8$; средним – $AUC = 0,6-0,7$; неудовлетворительным – $AUC = 0,5-0,6$. Выбор оптимальной «точки разделения» – значение уровня исследуемых показателей, которое обеспечивает максимальные значения чувствительности и специфичности проводили по точке перегиба кривой (максимально удаленная точка от линии равновероятного прогноза, для которого показатели чувствительности и специфичности равны 50%). В качестве положительного результата в проведенном исследовании рассматривали уровень миелопероксидазы в ротовой жидкости при хроническом стоматите.

По результатам ROC-анализа получили характеристическую кривую уровня МПО группы А и группы С. Оптимальной «точкой разделения» для миелопероксидазы, является величина 198,08 U/L. В этой точке чувствительность равна 100%, а специфичность составила 100%. AUC (площадь под кривой) составляет 1,00, что свидетельствует об отличной диагностической эффективности сформированной модели.

Далее получили характеристическую кривую уровня МПО в группе В и группе D. Оптимальной «точкой разделения» для миелопероксидазы является величина 217,5 U/L. В этой точке чувствительность равна 83,3%, а специфичность составила 100%. AUC (площадь под кривой) составляет 0,958

что свидетельствует об очень хорошей диагностической эффективности сформированной модели.

Сформировав общую группу детей с хроническим стоматитом и определением уровня МПО в сопоставлении с уровнем МПО у пациентов без стоматита в анамнезе по результатам ROC-анализа получили характеристическую кривую. Оптимальной «точкой разделения» для миелопероксидазы, является величина 217,5 U/L. В этой точке чувствительность равна 83,3%, а специфичность составила 83,3%. AUC (площадь под кривой) составляет 0,84, что свидетельствует об очень хорошей диагностической эффективности сформированной модели. При значениях миелопероксидазы, 217,5 U/L и более можно с высокой степенью достоверности говорить о хронизации стоматита у пациентов детского возраста.

Положительный эффект предлагаемого изобретения заключается в том, что предложенный способ обладает высокой диагностической чувствительностью и специфичностью и позволяет определить хронизацию стоматита детского возраста в различные периоды формирования слизистой оболочки полости рта.

Пример 1.

Пациент Б., 12 лет. Жалобы на боль в полости рта, слабость, вялость, субфебрильную температуру тела.

В анамнезе: появление патологических элементов поражений в полости рта каждые три-четыре месяца на протяжении пяти лет. Получает терапию согласно протоколам лечения.

Со слов родителей пациента хронические заболевания в анамнезе отсутствуют.

Профилактический осмотр стоматолога. Состояние полости рта: слизистая оболочка десны гиперемирована, отечна, умеренно увлажнена, множественные первичные и вторичные элементы поражений на слизистой щек, губ, дорсальной поверхности языка, твердого неба. Пальпация

слизистой в области элементов поражений болезненная, присутствует кровоточивость десен.

Регионарные лимфатические узлы (поднижнечелюстные справа и слева) увеличены, более 1 см., незначительно болезненные, мягко-эластичные, подвижные.

Поставлен диагноз: хронический рецидивирующий афтозный стоматит.

При проведении исследований проб нестимулированной ротовой жидкости выявлен уровень МПО – 477,73 U/L, что подтверждает хронизацию процесса и позволяет изменить тактику терапии с применением на фоне стандартного лечения иммуномодулирующих препаратов.

Пример 2.

Пациент А., 5 лет. Жалобы на отказ от приема пищи.

В анамнезе: появление патологических элементов поражений в полости рта каждые полгода на протяжении двух лет. Получает терапию согласно протоколам лечения.

Со слов родителей пациента хронические заболевания в анамнезе отсутствуют. Имеется вредная привычка грызть ногти, карандаши, ручки.

Профилактический осмотр стоматолога. Состояние полости рта: слизистая оболочка десны гиперемирована, отечна, умеренно увлажнена, множественные первичные и вторичные элементы поражений на слизистой щек и губ. Пальпация слизистой в области элементов поражений болезненная.

Регионарные лимфатические узлы (поднижнечелюстные справа и слева) увеличены, не более 1 см., безболезненные, мягко-эластичные, подвижные.

Поставлен диагноз: хронический рецидивирующий афтозный стоматит.

При проведении исследований проб нестимулированной ротовой жидкости выявлен уровень МПО – 252 U/L, что подтверждает хронизацию процесса и позволяет изменить тактику терапии с применением на фоне стандартного лечения иммуномодулирующих препаратов.

Источники информации:

1. Царев, В.Н. Микробиология, вирусология и иммунология полости рта. Москва: Издательская группа «ГЕОТАР Медиа». – 2016. – С. 305–322.
2. Романенко, Е.Г. Показатели местного иммунитета полости рта у детей с хроническим катаральным гингивитом в динамике лечения. Современная стоматология. – 2013. – №1. – С. 89–91.
3. Гуленко, О.В., Хагурова, С.Б. Состояние гуморального иммунитета полости рта у детей с нервно-психическими расстройствами. Вестник ВолгГМУ. –2017. – №3. – С. 41–44.
4. Muns G., Liesen H., Riedel H., Bergmann K-C. Einfluss von langstrckenlauf auf den IgA-gehalt in nasensekret und speichel. Deut. Zeit. Sportmed. 1989. 40. 63 – 65.
5. Патент RU № 2377568, 27.12.2009.
6. Кабанова, А.А. Миелопероксидаза ротовой жидкости у пациентов с одонтогенными флегмонами / А.А. Кабанова, В.К.Окулич, Н.Ю. Богдан // Вестник ВГМУ. – 2011. – Том 10. – №1. – С. 149–153.
7. Патент UA № 11695, 15.01.2006.
8. Заплутанова, Д.А. Клинико-лабораторная оценка стоматологических заболеваний на фоне туберкулезной инфекции / Диссертация / Нижний Новгород. – 2017. – С. 51–52.
9. Патент RU № 2613892, 18.02.2016.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ диагностики хронизации воспалительного процесса слизистой оболочки полости рта у детей с хроническим стоматитом, заключающийся в том, что определяют уровень миелопероксидазы в нестимулированной ротовой жидкости, и при значении 198,08 U/L и более у детей 4-7 лет в первичном периоде формирования слизистой, а у детей 8-12 лет во вторичном периоде формирования слизистой при значении 217,5 U/L и более диагностируют хронизацию стоматита.

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202391460

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:
G01N 33/573 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
G01N 33/50, G01N 33/573

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
ЕАРАТIS, Espacenet, Patentscope, eLibrary.ru, Embase, PubMed, КиберЛенинка, Google.

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	КАБАНОВА А.А. и др. Содержание миелопероксидазы в ротовой жидкости и ее взаимосвязь с клиническими характеристиками у пациентов с одонтогенными флегмонами. РОССИЙСКАЯ СТОМАТОЛОГИЯ, 2012, №3, с. 61-66 реферат	1
A	UA 5918 U (КЛИМЕНКО Н.А. и др.) 2005-03-15 реферат	1
A	КАРПУК И.Ю. и др. Увеличение уровня миелопероксидазы в ротовой жидкости после орально-буккальной провокации с компонентами стоматологических материалов у пациентов с их непереносимостью. РОССИЙСКИЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ, 2017, том 11(20), №4, с. 57-64 реферат	1
A	ХРИПАЧ Л.В. и др. Адаптивные изменения биохимических и иммунологических показателей смешанной слюны при воздействии загрязнений атмосферного воздуха на детей дошкольного возраста. МЕЖДУНАРОДНЫЙ ЖУРНАЛ ПРИКЛАДНЫХ И ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ, 2019, №6, с. 68-73 реферат	1
A	CHEN M. et al. Oxidative stress-related biomarkers in saliva and gingival crevicular fluid associated with chronic periodontitis: A systematic review and meta-analysis. J CLIN PERIODONTOLOGY, 2019, p. 608-622 реферат	1

последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:
«А» - документ, определяющий общий уровень техники
«D» - документ, приведенный в евразийской заявке
«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее
«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.
"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности
«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **08/08/2023**

Уполномоченное лицо:
Заместитель начальника Управления экспертизы
Начальник отдела химии и медицины


А.В. Чеван