



УКРАЇНА

(19) UA (11) 51148 (13) A

(51) 6 G01N33/68

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДВидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ЛОКАЛЬНОГО ІМУНІТЕТУ В ПОРОЖНИНІ РОТА**

1

2

(21) 2002010448

(22) 17 01 2002

(24) 15 11 2002

(46) 15 11 2002, Бюл. №11, 2002 р.

(72) Афоніна Галина Борисівна, Савичук Олександр Васильович, Колесова Наталя Валентинівна, Бордонос Володимир Герасимович, Здоренко Наталя Вікторівна

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ

(57) Спосіб оцінки локального імунітету в порожнині рота, який передбачає визначення функціональної активності клітин з поверхні слизової оболонки порожнини рота, який відрізняється тим, що як клітини використовують

лімфоцити, які виділяють зі змивів з поверхні слизової оболонки порожнини рота на градієнті фікол-верографіну та інкубують з сенсibiliзованими кроплячими протиеритроцитарними антитілами еритроцитами барана, потім обробляють перекисом водню і метолом, після чого на спектрофотометрі з довжиною хвилі 468 нм визначають екстинкцію в пробах з еритроцитами (Ее) та досліджуваному зразку (Ео), визначають показник антиліпозалежної клітинної опосередкованої цитотоксичності за формулою $Ee-Eo/Ee$ та діагностують пригнічення локального імунітету при зниженні цього показника більш ніж на 33 % порівняно зі здоровими пацієнтами

Винахід, який заявляється, стосується галузі медицини, а саме імунології і стоматології, та призначений для оцінки стану локального імунітету в порожнині рота

Визначення стану антиінфекційної резистентності верхніх відділів травного каналу, в т.ч. локального імунітету порожнини рота, є важливим і актуальним завданням експериментальної і клінічної медицини [1]. Наявність ефективного кількісного методу оцінки функціональної активності клітинної ланки імунітету дозволить підвищити інформативність лабораторної оцінки стану порожнини рота у пацієнтів з хронічними ураженнями слизової оболонки порожнини рота (СОПР) і інших ділянок верхніх відділів травного каналу

Відомий спосіб визначення стану імунітету порожнини рота шляхом визначення вмісту секреторного імуноглобуліну А у змішаній слині. Однак, вказаний спосіб дозволяє охарактеризувати стан лише гуморальної ланки імунітету і не може використовуватись для прогнозування перебігу захворювань, які спричиняються внутрішньоклітинними ураженнями, в першу чергу вірусними і пухлинними. Патогенетичні механізми, притаманні цим захворюванням, визначаються активністю клітинної ланки імунної відповіді [2].

Найбільш близьким до запропонованого технічного рішення аналогом (прототипом) є спосіб

оцінки локального імунітету порожнини рота шляхом визначення структури хроматину та функціонального стану клітин з поверхні слизової оболонки порожнини рота [3].

Структура хроматину клітин з поверхні епітелію порожнини рота є непрямою ознакою активізації чи супресії їх метаболізму, але не відображає участі цих клітин у формуванні імунних реакцій. Таким чином, технічне рішення, запропоноване у прототипі, не дозволяє судити про ступінь порушень локального імунітету порожнини рота [7].

Завдання, яке вирішується у даному винаході, полягає у створенні способу визначення стану локального імунітету порожнини рота, який би дозволяв кількісно оцінювати функціональну активність клітин з поверхні слизової оболонки порожнини рота

Технічний результат, який досягається, полягає у можливості визначення нормального стану, пригнічення чи активації показників клітинної ланки локального імунітету порожнини рота у пацієнтів з різними формами ураження СОПР та оцінки імуномодулюючої ефективності різних методів лікування

Поставлена задача вирішується завдяки тому, що у відомому способі визначення стану локального імунітету порожнини рота, який передбачає визначення функціональної активності клітин з

(13) A

(11) 51148

(19) UA

поверхні слизової оболонки порожнини рота, згідно винаходу, у якості клітин використовують лімфоцити, які виділяють зі змивів з поверхні слизової оболонки порожнини рота на градієнті фікол-верографіну та інкубують з сенсibilізованими кролячими протиеритроцитарними антитілами еритроцитами барана, потім обробляють перекисом водню і метолом, після чого на спектрофотометрі з довжиною хвилі 468нм визначають екстинцію в пробах з еритроцитами (Ee) та досліджуваному зразку (Eo), визначають показник антитилозалежної клітинної опосередкованої цитотоксичності за формулою $Ee-Eo/Ee$ та діагностують пригнічення локального імунітету при зниженні показника більш ніж на 33% порівняно зі здоровими пацієнтами

Відмінною особливістю способу оцінки локального імунітету порожнини рота, що заявляється, є те, що у якості клітин використовують лімфоцити, які виділяють зі змивів з поверхні слизової оболонки порожнини рота на градієнті фікол-верографіну та інкубують з сенсibilізованими кролячими протиеритроцитарними антитілами еритроцитами барана, потім обробляють перекисом водню і метолом, після чого на спектрофотометрі з довжиною хвилі 468нм визначають екстинцію в пробах з еритроцитами (Ee) та досліджуваному зразку (Eo), визначають показник антитилозалежної клітинної опосередкованої цитотоксичності за формулою $Ee-Eo/Ee$ та діагностують пригнічення локального імунітету при зниженні показника більш ніж на 33% порівняно зі здоровими пацієнтами

Спосіб оцінки локального імунітету порожнини рота здійснюється наступним чином. Порожнину рота пацієнта ополіскують фізіологічним розчином з рН 7,4 протягом п'яти хвилин. Через 7-10 хвилин пацієнту пропонують утримувати у роті 20мл фізіологічного розчину протягом п'яти хвилин і сплюнути ротову рідину у стерильну пробірку. Отриманий таким чином змив клітин центрифугують, осад ресуспензують в 2 мл середовища 199, потім виділяють лімфоцити за стандартною методикою на градієнті фікол-верографіну [3]. Виділені лімфоцити інкубують з еритроцитами, попередньо сенсibilізованими антитілами, у співвідношенні 1:20 при температурі 37°C протягом 18 годин та обробляють перекисом водню і метолом. Суміш спектрофотометрують при довжині хвилі 486нм і визначають екстинцію дослідного взірця (Eo). У якості контролю використовують показники екстинції сенсibilізованих еритроцитів (Ee). Антитилозалежну клітинно-опосередковану цитотоксичність (АЗКОЦ) визначають з урахуванням екстинції обох проб за формулою

$$\text{АЗКОЦ} = Ee - Eo / Ee (\%)$$

Аналогічну процедуру дослідження здійсню-

ють у групі здорових пацієнтів. Оцінку стану локального імунітету здійснюють шляхом порівняння показників АЗКОЦ у пацієнта і групи здорових. Для оцінки ступеня пригнічення чи стимуляції АЗКОЦ використовують традиційний для імунологічних досліджень метод визначення ступеня імунної недостатності/стимуляції (СІН/СІС) [4]. Пригнічення чи стимуляцію локального імунітету оцінюють як СІН/СІС I-го ступеня при зміні показника у межах 20-33%, II-го ступеня – 33-66%, III-го – понад 66%.

Конкретний приклад здійснення. Визначення АЗКОЦ здійснювали у 25 дітей з хронічним рецидивуючим афтозним стоматитом та 25 здорових дітей віком 5-15 років. Для цього порожнину рота у всіх обстежених дітей попередньо ополіскували фізіологічним розчином з рН 7,4 протягом п'яти хвилин. Через 7-10 хвилин діти утримували у роті по 20мл фізіологічного розчину протягом п'яти хвилин і сплюнували ротову рідину у стерильні пробірки. Отриманий таким чином змив клітин центрифугували, осад ресуспензували у 2мл середовища 199, потім виділяли лімфоцити за стандартною методикою на градієнті фікол-верографіну [3]. Виділені лімфоцити інкубували з еритроцитами, попередньо сенсibilізованими антитілами, у співвідношенні 1:20 при температурі 37°C протягом 18 годин та обробляли перекисом водню і метолом. Вказану суміш спектрофотометрували при довжині хвилі 486нм і визначали показники екстинції у дітей з хронічним рецидивуючим афтозним стоматитом (Eo). У якості контролю використовували показники екстинції сенсibilізованих еритроцитів (Ee). Антитилозалежну клітинно-опосередковану цитотоксичність взірців у дітей зі стоматитом (АЗКОЦ-с) визначали за формулою $\text{АЗКОЦ-с} = Ee - Eo / Ee (\%)$

Аналогічну процедуру дослідження здійснювали у групі здорових пацієнтів і визначали антитилозалежну клітинно-опосередковану цитотоксичність здорових (АЗКОЦ-з).

Оцінку стану локального імунітету у дітей з хронічним рецидивуючим афтозним стоматитом здійснювали шляхом порівняння показників АЗКОЦ-с і АЗКОЦ-з. Для оцінки ступеня пригнічення чи стимуляції АЗКОЦ використовували традиційний для імунологічних досліджень метод ступеня імунної недостатності/стимуляції (СІН/СІС) [4]. Пригнічення чи стимуляцію локального імунітету оцінювали як СІН/СІС I-го ступеня при зміні показника у межах 20-33%, II-го ступеня – 33-66%, III-го – понад 66%.

Результати дослідження порівнювали з показниками дітей з хронічним рецидивуючим афтозним стоматитом (25 осіб) та здорових (25 осіб), обстежених за методом прототипу [3] (таблиця 1).

Таблиця 1

Результати порівняльного аналізу визначення стану локального імунітету за запропонованим методом і прототипом

Способи визначення стану локального імунітету		Здорові (n=25)	Хворі зі стоматитом (n=25)
Прототип	Кількість змінених клітин (%)	11,1±0,8	18,4±2,4
Запропонований	АЗКОЦ (%)	25,3±1,5	12,6±1,1

Результати дослідження за методом прототипу свідчать про підвищення у 1,65 рази вмісту клітин з порушенням структури хроматину у порожнині рота дітей з ХРАС, що опосередковано свідчить про пригнічення показників локального імунітету порожнини рота. Однак, отримані результати не дозволяють визначити характер і ступінь місцевого імунodefіциту.

Аналіз результатів визначення стану локального імунітету порожнини рота доводить зменшення у 2 рази показників АЗКОЦ у дітей з хронічним рецидивуючим афтозним стоматитом, тобто вказує на 50% дефіцит клітин-кіперів. Вказані зміни можна оцінити як пригнічення імунітету II-го ступеня.

Перевагами запропонованого способу перед прототипом є те, що він дозволяє охарактеризувати стан локальної імунної відповіді стосовно бактеріальних, вірусних та пухлинних антигенів, оцінити ступінь вираженості імунних порушень, передбачає застосування автоматизованих вимірів та спрощеної математичної формули.

Список літератури, яка використовувалась

- 1 Савицкая К И , Воробьева А А , Русанова Е В Роль неспорообразующих анаэробов в формировании микробного пейзажа, содержимого толстой кишки у больных с воспалительными процессами различной локализации // Вестник Российской Академии медицинских наук –1996 – № 2 – С 15–23
- 2 Лебедев К А , Понякина И Д Иммунограмма в клинической практике – М Наука, – 1990 –С 224
- 3 Маянский А Н , Воробьева О Н , Малишева О Ф и соавт. Взаимоотношения между естественной колонизацией и адгезией бактерий к буккальному эпителию у человека // Журнал микробиологии, микробиологии, эпидемиологии и иммунологии – 1987 –№ 2 –С 18–20
- 4 Земсков А М , Земсков В М Дополнительные методы оценки иммунного статуса // Клиническая лабораторная диагностика –1994 – № 3 –С 34–35

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)

вул. Сим'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна

(044) 456 – 20 – 90

ТОВ «Міжнародний науковий комітет»

вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна

(044) 216 – 32 – 71