

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СКОРОСТИ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ  
ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА В ТКАНЯХ ПЕРИОДОНТА  
(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: учреждение образования  
«Белорусский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: к.м.н., доцент Казеко Л.А., к.м.н., доцент Захарова В.А., к.м.н.  
Анфиногенова Е.А., к.м.н., доцент Летковская Т.А., д.м.н., профессор  
Черствый Е.Д.

Минск, 2020

**Список сокращений:**

ТІМР – тканевый ингибитор матриксной металлопротеиназы

БСА – бычий сывороточный альбумин

ИГХ – иммуногистохимия

eТІМР – эпителиальная экспрессия ТІМР

sТІМР – стромальная экспрессия ТІМР

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) представлен метод определения степени тяжести прогрессирования воспалительного процесса в тканях периодонта на основе морфометрического анализа иммуногистохимической экспрессии матриксных металлопротеиназ в биопсийном материале десен, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику заболеваний периодонта.

Инструкция предназначена для врачей-стоматологов, врачей-патологоанатомов и иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам в стационарных и(или) амбулаторных условиях, и(или) в условиях отделения дневного пребывания.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

К05.3 Хронический пародонтит (периодонтит)

- сложный
- простой

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Аллергическая реакция у пациента на лекарственные средства для местной анестезии.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И Т.Д.**

– Микроскоп

- микротом с возможностью изготовления гистологических срезов толщиной 2,5 мкм
- программируемая барокамера Pascal или микроволновая печь
- тканевой процессор
- заливочный центр
- холодильник
- вытяжной шкаф
- таймер
- автоматические дозаторы и наконечники к ним объемом 1-10 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл, лабораторная посуда (стеклянные емкости для фиксации материала, стаканы, контейнеры для предметных стекол, инструментарий для приготовления гистологических препаратов, кассеты и емкости для изготовления парафиновых блоков, предметные, силанизированные предметные и покровные стекла)
- реактивы для гистологической проводки тканей, изготовления парафиновых блоков, приготовления микропрепаратов, окрашенных гематоксилином-эозином (ГЭ) (формалин, этанол, ксилол, парафин, воск, гематоксилин, эозин, глицерин, соляная кислота, аммиак, канадский бальзам);
- реактивы для проведения иммуногистохимического (ИГХ) исследования (ксилол, 96° этиловый спирт, перекись водорода 3%, Tris-HCl отмывочный буфер, pH 7.5, цитратный буфер для демаскировки антигенов, pH 6.0, буфер для демаскировки антигенов, pH 9.0, первичные антитела к ММР1, ММР8, ММР9, ММР13, ММР14 (обязательным условием для применения антител является наличие в спецификации указания на возможность использования на формалин-фиксированных, заключенных в парафин тканях человека), системы визуализации к мышинным и кроличьим

антителам или универсальная система визуализации, хромоген – диаминобензидин (ДАБ), монтирующая среда для покровных стекол, карандаш для ИГХ, гематоксилин Майера).

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

Выполнение анестезии и инцизионной биопсии десны по общепризнанной методике

### **2.Изготовление гистологических препаратов**

Биопсийный материал десен дегидратируется в батарее спиртов восходящей концентрации при помощи тканевого процессора, заключается в парафин с ориентацией плоскости биопсийного среза перпендикулярно плоскости среза парафинового блока с использованием заливочного центра (предпочтительно с наличием «холодной точки» для сохранения правильной ориентации биоптата). Из блоков изготавливаются гистологические срезы толщиной 2,5 мкм, которые окрашиваются ГЭ и заключаются в «канадский бальзам» или аналогичную среду, покрываются покровным стеклом. Предпочтительно из одного парафинового блока изготавливать 1 стекло.

**3.Определение экспрессии MMP1, MMP8, MMP9, MMP13, MMP14 при периодонтитах.**

Для контроля активности первичных моноклональных антител в каждой серии необходимо проведение одного отрицательного и одного положительного контрольного окрашивания. В качестве отрицательного контрольного окрашивания срезы вместо инкубации с первичным антителом покрываются 1% раствором бычьего сывороточного альбумина. В качестве положительного контроля для антител с известной высокой экспрессией ИГХ маркеров может быть биопсийный материал: MMP1, MMP13, MMP14 – слизистой желудка, MMP8, MMP9 – костного мозга. Результаты исследования могут оцениваться только при отсутствии

окрашивания в отрицательном контрольном препарате и наличии окрашивания в положительном контрольном препарате.

4. Протокол ИГХ окрашивания с антителами к ММР1, ММР8, ММР9, ММР13, ММР14:

- Выдержать в термостате при 37 °С в течение ночи или при 60 °С – 1 час.
- Депарафинизация в ксилоле.
- Регидратация в спиртах и воде.
- Демаскировка антигенов в нагреваемой барокамере с демаскировочным буфером (рН буфера, время процедуры для различных антител указаны в таблице 1). После обработки срезы оставить остывать при комнатной температуре на 20 минут;

Таблица 1 – Параметры обработки срезов в барокамере для первичных антител

Название антитела	рН демаскировочного буфера	Температура нагрева буфера	Время процедуры
Анти-ММР1	рН 9.0	125 °С	1 минута
Анти-ММР8	рН 9.0	125 °С	2,5 минуты
Анти-ММР9	рН 9.0	125 °С	2,5 минуты
Анти-ММР13	рН 9.0	125 °С	30 секунд
Анти-ММР14	рН 9.0	125 °С	30 секунд

- Промыть в отмывочном буфере 3 раза по 5 минут;
- Блокада эндогенной пероксидазы 3% раствором перекиси водорода – 20 минут.
- Промыть в отмывочном буфере (3 раза по 5 минут).
- Срезы обвести карандашом для ИГХ (отступить от края среза 4-5 мм);
- Блокирующий 1% раствор бычьего сывороточного альбумина – 30 минут.

- Инкубация с антителами, разведенными в дилуенте, по 150  $\mu$ l на 1 стекло, в течение 30 минут на шейкере и в течение 12-18 часов в холодильнике при температуре 4-6  $^{\circ}$ C в следующих разведениях: Анти-ММР1 1:1000, Анти-ММР8 1:1000, Анти-ММР9 1:1600, Анти-ММР13 1:250, Анти-ММР14 1:500;
- Промыть в отмывочном буфере (2 раза по 5 минут).
- Визуализация при помощи универсальной полимерной системы визуализации в соответствии с инструкцией производителя;
- Промыть в отмывочном буфере 2 раза по 5 минут;
- нанести на срезы ДАБ. Раствор ДАБ приготовить в соответствии с рекомендациями изготовителя непосредственно перед нанесением на срезы. Длительность инкубации в ДАБ для Анти-ММР1 и Анти-ММР8 – 3 минуты, для Анти-ММР9, Анти-ММР13 и Анти-ММР14 – 5 минут;
- Контрокрашивание гематоксилином Майера.
- Заключение в канадский бальзам или аналогичную среду.

## 5. Интерпретация результатов ИГХ-окрашивания

Экспрессия ММР1 выявляется в биопсийном материале десны в виде цитоплазматического окрашивания лейкоцитов/гистиоцитов, фибробластов, эндотелия в коричневый цвет различной интенсивности (от светло- до темно-коричневого цвета).

Экспрессия ММР8 выявляется в биопсийном материале десны в виде цитоплазматического окрашивания лейкоцитов/гистиоцитов, фибробластов, эндотелия в коричневый цвет различной интенсивности (от светло- до темно-коричневого цвета).

Экспрессия ММР9 выявляется в биопсийном материале десны в виде цитоплазматического окрашивания лейкоцитов/гистиоцитов, фибробластов, эпителиальных клеток (преимущественно базальных слоев)

в коричневый цвет различной интенсивности (от светло- до темно-коричневого).

Экспрессия ММР13 выявляется в биопсийном материале десны в виде цитоплазматического окрашивания лейкоцитов/гистиоцитов, фибробластов, эндотелия в коричневый цвет различной интенсивности (от светло- до темно-коричневого цвета).

Экспрессия ММР14 выявляется в биопсийном материале десны в виде цитоплазматического окрашивания эпителиальных клеток (преимущественно базальных слоев), фибробластов, эндотелия и лейкоцитов в коричневый цвет различной интенсивности (от светло- до темно-коричневого цвета).

#### 6. Морфометрический анализ.

Для морфометрического анализа выполняется сканирование микропрепаратов с применением цифрового слайд-сканера или фотографирование микропрепаратов при помощи микроскопа с цифровой камерой с последующим программным анализом изображений с использованием Aperio Image Scope или аналога. В рамках программного анализа изображений проводится выделение 9 случайных непересекающихся полей зрения (объектив 40 или цифровое увеличение 8), с анализом ИГХ окрашивания в поле зрения в целом (которое включает эпителиальный и стромальный компонент в равных пропорциях – 3 поля зрения), а также отдельно в эпителиальном (3 поля зрения) и стромальном компоненте десны (3 поля зрения).

В процессе программного анализа экспрессии матричных металлопротеиназ в биопсийном материале десны интенсивность коричневой окраски (продуктов реакции ДАБ-хромогена) измеряется Aperio Image Scope или аналогом автоматически и разделяется на 3 уровня

интенсивности и негативную реакцию с подсчетом числа и интенсивности пикселей различной интенсивности. Результат программной оценки параметров позитивности и доли пикселей с высокой и умеренной интенсивностью имеет прямую взаимосвязь, а интенсивности экспрессии – обратную взаимосвязь с данными визуальной оценки. Полученные данные позволяют рассчитать следующие параметры для каждого маркера (объектив 40):

**позитивность** (Positivity – отношение числа позитивных пикселей к общему числу позитивных и негативных пикселей  $\times 100\%$ ),

**доля пикселей с высокой и умеренной интенсивностью** ( $N_{sr+p}$  – отношение числа позитивных пикселей с высокой и умеренной интенсивностью к общему числу позитивных и негативных пикселей  $\times 100\%$ ),

**индекс интенсивности ИГХ реакции** в иммунопозитивных участках (index – отношение суммы интенсивностей позитивных пикселей к общему числу позитивных пикселей).

**общий индекс интенсивности ИГХ реакции** (INDEX – отношение суммы интенсивностей негативных и позитивных пикселей к общему числу позитивных и негативных пикселей).

## 7. Оценка морфометрических данных

7.1. Быстро прогрессирующее течение периодонтита определяется при совокупности следующих морфометрических показателей:

- показатели общей и стромальной экспрессии MMP1: позитивность  $>91\%$  и  $>68\%$ , доля пикселей с высокой и умеренной интенсивностью  $>47,8\%$  и  $>33,5\%$ , общий индекс интенсивности и индекс интенсивности ИГХ реакции в иммунопозитивных участках  $\leq 155$  и  $\leq 177$ ;

- показатели общей экспрессии MMP8: общий индекс интенсивности и индекс интенсивности ИГХ реакции в иммунопозитивных участках  $\leq 129$  и  $\leq 129$ ;

- показатели общей и стромальной экспрессии MMP9: позитивность  $\leq 3,86\%$  и  $\leq 0,72\%$ , доля пикселей с высокой и умеренной интенсивностью  $\leq 1,63\%$  и  $\leq 0,66\%$ ;

- показатели общей экспрессии MMP13: общий индекс интенсивности и индекс интенсивности ИГХ реакции в иммунопозитивных участках  $\leq 187$ ;

- показатели позитивности общей и стромальной экспрессии MMP14  $>71\%$  и  $>76\%$  соответственно, доли пикселей с высокой и умеренной интенсивностью общей экспрессии  $>43,1\%$ .

7.2 Во всех остальных случаях течение периодонтита определяется как хроническое.

### **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

<b>Возможные ошибки и осложнения</b>	<b>Пути устранения</b>
1.Использование реактивов с истекшим сроком годности или неправильно хранившихся 2.Неправильное разведение реактивов, несоблюдение временного и температурного режима 3. Ошибки при проведении программного анализа экспрессии матричных металлопротеиназ	Строгое соблюдение методических требований при проведении ИГХ исследования  Строгое соблюдение техники проведения оценки морфометрических показателей