

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра

Д.В.Чередниченко

19.11. 2021 г.

Регистрационный № 125 – 1121



МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ХАРАКТЕРА ТЕЧЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА В ТКАНЯХ ПЕРИОДОНТА

(инструкция по применению)

ОРГАНИЗАЦИИ-РАЗРАБОТЧИКИ: учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет».

АВТОРЫ: к.м.н., доцент Казеко Л.А., к.м.н., доцент Захарова В.А., к.м.н., доцент Летковская Т.А., Бенеш Ю.Д.

Минск, 2021

Список сокращений:

БСА – бычий сывороточный альбумин

ДАБ – диаминобензидин

ИГХ – иммуногистохимия

ТІМР – тканевый ингибитор матричной металлопротеиназы

eТІМР – эпителиальная экспрессия ТІМР

sТІМР – стромальная экспрессия ТІМР

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) представлен метод прогнозирования характера течения воспалительного процесса в тканях периодонта на основе морфометрического анализа экспрессии тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ в биопсийном материале десен, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику заболеваний периодонта.

Инструкция предназначена для врачей-стоматологов и врачей-патологоанатомов, оказывающих медицинскую помощь пациентам с патологией периодонта 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

Противопоказания, соответствующие таковым для медицинского применения лекарственных средств и медицинских изделий, необходимых для реализации метода, изложенного в настоящей инструкции.

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

- микроскоп с цифровой видеокамерой (цифровой слайд-сканер);
- микротом с возможностью изготовления гистологических срезов толщиной 2,5 мкм;
- программируемая барокамера 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 (формалин, этанол, ксилол, парафин, гематоксилин, эозин, глицерин, соляная кислота, монтирующая среда);
- реактивы для проведения 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 TIMP1, TIMP2 (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 – ДАБ, монтирующая среда для покровных стекол, карандаш для ИГХ, гематоксилин Майера).

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод, изложенный в настоящей инструкции, реализуется в несколько этапов:

1. Обработка полости рта и операционного поля антисептическим

лекарственным средством.

2. Проведение инфильтрационной анестезии в области предполагаемого проведения биопсии.

3. Инцизионная биопсия десны.

4. Изготовление гистологических препаратов.

5. Определение экспрессии TIMP1 и TIMP2.

5.1. 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 БСА. В качестве положительного контроля для антител с известной высокой экспрессией ИГХ маркеров может быть биопсийный материал: TIMP1 – предстательная железа, TIMP2 – почка. Результаты исследования могут оцениваться только при отсутствии окрашивания в отрицательном контрольном препарате и наличии окрашивания в положительном контрольном препарате.

5.2. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к TIMP1, TIMP2:

– выдержать гистологические препараты в термостате при 37 °С не менее 12 часов 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-TIMP1	рН=9,0	125°	2'30''

Анти-TIMP2	pH=9,0	1250	2'30''
------------	--------	------	--------

- 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 БСА – 30 минут;
 - инкубация с антителами, разведенными в дилуенте, по 150 µl на 1 стекло, в течение 30 минут на шейкере и в течение 12-18 часов в холодильнике при температуре 4-6 0C в следующих разведениях: Анти-TIMP1 1:50, Анти-TIMP2 1:800;
 - 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-TIMP1 – 4 минуты, Анти-TIMP2 – 5 минут;
 - контрокрашивание гематоксилином Майера;
 - заключение в монтирующую среду.

5.3. Анализ результатов ИГХ-окрашивания

Экспрессия TIMP1 выявляется в биопсийном материале десны в виде гомогенного цитоплазматического и мембранного окрашивания эпителия десны, фибробластов, лейкоцитов/гистиоцитов в коричневый цвет различной интенсивности (от светло- до темно-коричневого цвета).

Экспрессия TIMP2 выявляется в биопсийном материале десны в виде гомогенного цитоплазматического и мембранного окрашивания эпителия десны,

фибробластов, лейкоцитов/гистиоцитов и эндотелиоцитов в коричневый цвет различной интенсивности (от светло- до темно-коричневого цвета).

6. Морфометрический анализ микропрепаратов.

Для морфометрического анализа выполняется сканирование микропрепаратов с применением цифрового слайд-сканера или фотографирование микропрепаратов при помощи микроскопа с цифровой камерой с последующим программным анализом морфологических изображений. В рамках программного анализа изображений проводится выделение 6 случайных непересекающихся полей зрения (цифровое увеличение $\times 20$), 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 TIMP1, TIMP2 в биопсийном материале десны интенсивность коричневой окраски (продуктов реакции ДАБ-хромогена) измеряется 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. Прогнозирование характера течения воспалительного процесса в тканях периодонта.

7.1. Быстро прогрессирующий характер течения воспалительного процесса в тканях периодонта прогнозируется в случаях, если:

– показатели общей и эпителиальной экспрессии TIMP1: позитивность $\leq 5\%$ и $\leq 60\%$, общая доля пикселей с высокой и умеренной интенсивностью общей экспрессии $\leq 3,38\%$, общий индекс интенсивности и индекс интенсивности ИГХ реакции в иммунопозитивных участках > 190 ;

– показатели общей и эпителиальной экспрессии TIMP2: позитивность $> 73\%$ и $> 87\%$, общая доля пикселей с высокой и умеренной интенсивностью общей экспрессии $> 60,4\%$,

7.2. В случаях, не указанных в подпункте 7.1. пункта 7. настоящей инструкции, прогнозируется хронический характер течения воспалительного процесса в тканях периодонта.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Возможные ошибки и осложнения	Пути устранения
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 матриксных металлопротеиназ	Соблюдение методических требований при проведении ИГХ исследования Соблюдение техники проведения оценки морфометрических показателей

Контроль кинической эффективности: не требуется.