



МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119475** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/50 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2017 03564	(72) Винахідник(и): Бондаркова Анна Миколаївна (UA), Приступа Людмила Никодимівна (UA), Кмита Владислава Володимирівна (UA), Чередніченко Наталія Анатоліївна (UA)
(22) Дата подання заявки: 12.04.2017	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.09.2017	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.09.2017, Бюл.№ 18	(73) Власник(и): СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, 40007 (UA)

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ НЕКОНТРОЛЬОВАНОГО ПЕРЕБІГУ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування неконтрольованого перебігу бронхіальної астми включає виділення геномної ДНК з біологічного матеріалу з наступним виявленням поліморфізму гена та визначення за наявності патологічного генотипу рівня контролю бронхіальної астми (БА). Як біологічний матеріал для виділення геномної ДНК використовують венозну кров хворих, а виявлення поліморфізму генів здійснюють відносно гена $ADRB_2$ методом полімеразної ланцюгової реакції, і для визначення патологічного генотипу ураховують наявність Glu алеля за Gln27Glu поліморфізмом гена $ADRB_2$, за результатом якого у хворих прогнозують неконтрольований перебіг БА.

UA 119475 U

Корисна модель належить до галузі клінічної медицини, а саме до внутрішніх хвороб, пульмонології та медичної генетики, і може бути використана з метою прогнозування та корекції лікування бронхіальної астми (БА).

5 БА є серйозною соціальною, епідеміологічною та медичною проблемою. За останні роки спостерігається зниження контролю БА, незважаючи на проведення чисельних клінічних досліджень з метою удосконалення терапевтичного підходу до лікування. Наприклад, у Європі з 2006 по 2010 рр. відмічено зниження контролю БА на 16 %, а у Російській Федерації за термін від 2010 по 2013 рр. - на 23 % [Архипов В. В. Контроль над бронхиальной астмой в России: результаты многоцентрового наблюдательного исследования НИКА / В. В. Архипов // Пульмонология. - 2011. - № 6.-С. 87-93.; Demoly P. Repeated cross-sectional survey of patient-reported asthma control in Europe in the past 5 years / P. Demoly // Eur. Respir. J. - 2012. - Vol. 21, № 123. - P. 66-74.; European respiratory society statement: asthma control and exacerbations, standardizing endpoints for clinical asthma trials and clinical practice. Part 2 / D.R. Taylor [et al.] // J. Pulmonology. - 2007. - Vol. 55-P. 762-765.].

15 Мета сучасних керівництв з контролю та лікування БА полягає у забезпеченні повного контролю БА, підвищенні якості життя пацієнтів та абсолютної їх адаптації у соціумі за рахунок індивідуального підбору лікування із мінімальною побічною дією [GINA 2016 [електронний ресурс] // www.ginasthma.org; Rees J. Asthma control in adults / J. Rees // BMJ. - 2006.-Vol. 332.-P. 767-771].

20 За останній час провідні лабораторії світу вивчають асоціації ряду генів із розвитком БА [Асанов А. Ю., Намазова Л. С., Пинелис В. Г., Журкова Н. В. Генетические основы подверженности к бронхиальной астме / Пед. Фарм. -2008. - Т.5 (№ 4), С. 31-37; Фрейдин М. Б. Генетические основы подверженности к бронхиальной астме. Мол екулярно-био логические технологии в медицинской практике / Под ред. А. Б. Масленникова. Новосибирск: Изд. дом "Манускрипт". - 2001. - С. 130-141.], список генів-кандидатів постійно розширюється. Однак до цього часу немає чіткого уявлення про роль кожного гена, можливість виділення головного гена, взаємодію мутантних генів і факторів середовища у патогенезі БА. Особливе місце серед генів-кандидатів, що відіграють роль у розвитку БА, займають гени β_2 -адренорецепторів (ADRB₂). Найбільш вивченим та поширеним є поліморфізм з амінокислотною заміною Gln27Glu, який викликає зниження кількості рецепторів на поверхності клітин бронхів після взаємодії з β_2 -агоністами та сприяє розвитку бронхіальної гіперреактивності (БГР) [Chiang C. H., Lin M. W., Yang U. C. Association of (3(2)-adrenergic receptor polymorphisms with asthma / J. Chin. Med. Assoc. - 2012. - V. 7. - P. 635-643; Hizawa, N. Beta-2 adrenergic receptor genetic polymorphisms and asthma / J.Clin. Pharm. Ther. - 2009. № 34. P. 631-643].

35 Аналогом способу, що заявляється, є спосіб прогнозування тяжкого перебігу бронхіальної астми в дітей шкільного віку [Пат. №92406 U UA, МПК (2014.01) G01N 33/00. Опубл. 11.08.2014, бюл. №15], шляхом дослідження конденсату видихуваного повітря, індукованого мокротиння та типу ацетилювання. Недоліками цього способу є те, що не враховується полігенність та мультифакторіальність БА, у патогенезі якої задіяні гени різних патогенетичних ланок. А це в свою чергу не сприяє ефективності лікування даної групи хворих.

40 Найбільш близьким до способу, що заявляється, та вибраний як прототип, є спосіб прогнозування перебігу бронхіальної астми [Пат. №99863 U UA, МПК (2015.01) A61B 10/00. Опубл. 25.06.2015, бюл. №12]. Згідно цього способу першим етапом є виділення ДНК біологічного матеріалу, а саме з букального епітелію, з наступним виявленням поліморфізму генів лізосомного протеолізу і прогнозуванням тяжкості перебігу бронхіальної астми при наявності патологічного алеля.

Даний спосіб за рахунок взяття до уваги генетичних маркерів значно сприяє підвищенню ефективності лікування даної групи. Але недоліком цього способу є те, що прогнозування здійснюється лише алергічної БА у дітей без виявлення рівня контролю, а це знижує ефективність самого лікування.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалити спосіб шляхом визначення генотипів за Gln27Glu поліморфізмом гена ADRB₂, що дозволить передбачити перебіг захворювання і як результат підвищить ефективність самого лікування БА.

55 Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі прогнозування неконтрольованого перебігу БА, що включає виділення геномної ДНК з біологічного матеріалу з наступним виявленням поліморфізму гена та визначення за наявності патологічного генотипу рівня контролю бронхіальної астми, згідно із корисною моделлю, як біологічний матеріал для виділення ДНК використовують венозну кров хворих, а виявлення поліморфізму генів здійснюють відносно гена ADRB₂ методом полімеразної ланцюгової реакції, і для визначення

патологічного генотипу ураховують наявність Glu алеля за Gln27Glu поліморфізмом гена ADRB₂, за результатом якого у хворих прогноують неконтрольований перебіг БА.

Використання усіх суттєвих ознак способу, включаючи відмінні, дозволяє за рахунок виявлення Glu27Glu генотипу за Gln27Glu поліморфізмом гена ADRB₂ прогнозувати неконтрольований перебіг БА у хворих, сформулювати групи ризику щодо даного захворювання, що в цілому позитивно впливає на ефективність лікування даного захворювання.

Спосіб виконують наступним чином: венозну кров у хворих БА та практично здорових осіб набирали в стерильних умовах у моновети об'ємом 2,7 мл з калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти (11.7 мМ) як антикоагулянт ("Sarstedt", Німеччина), заморожували та зберігали при температурі -20 °С. ДНК виділяли з цільної крові із використанням наборів DIAtom DNA Prep 100 ("Isogene", Росія). Використаний метод базується на використанні лізуючого реагенту із гуанідинізоціонатом, який призначений для лізису клітин, солюбілізації клітинного дебрису, а також для денатурації клітинних нуклеаз. З присутності лізуючого реагенту ДНК активно сорбується на Nucleo™-сорбенті, потім легко відмивається від білків та солей спиртовим розчином. Згодом ДНК екстрагують із сорбента та переносять у стерильні вільні від ДНК та РНК мікропробірки. Отримана ДНК може безпосередньо використовуватися для проведення полімеразної ланцюгової реакції. Набір дозволяє виділяти із свіжого біологічного матеріалу високомолекулярну ДНК (40-50 тисяч пар нуклеотидів високої чистоти (OD_{260/280} нм 1,6-2,0). Вихід чистої ДНК з 100 мкл цільної крові становить 3-5 мкг. У процесі виділення ДНК ми дотримувалися рекомендацій, наведених у комерційному наборі, та проводили маніпуляції згідно наступного протоколу:

1. У пробірку об'ємом 1,5 мл внести 100 мкл цільної венозної крові та додати 400 мкл лізуючого розчину. Перемішати зміст пробірок обертанням 10 разів.

2. Термостатування суміші 5 хв при температурі 65 °С.

3. Центрифугування пробірок протягом 10 сек. при 5 000 об/хв та додавання ретельно взбавленої на вортексі 20 мкл суспензії сорбенту Nucleo™.

4. Перемішування проб протягом 10 хвилин.

5. Центрифугування пробірок протягом 10 сек. при 5 000 об/хв та видалення супернатанту за допомогою помпи, не торкаючись до осаду сорбенту.

6. Додавання 200 мкл лізуючого розчину, ретельне перемішування на вортексі до гомогенного стану.

7. Додавання 1 мл сольового розчину та перемішування пробірок 10 разів.

8. Центрифугування пробірок протягом 10 сек. при 5 000 об/хв та видалення супернатанту за допомогою помпи, не торкаючись до осаду сорбенту із ДНК.

9. Додавання 1 мл сольового розчину та перемішування пробірок на вортексі до гомогенного стану.

10. Центрифугування пробірок протягом 10 сек. при 5 000 об/хв та видалення супернатанту за допомогою помпи, не торкаючись до осаду сорбенту із ДНК.

11. Повторне виконання положень 9 та 10 протоколу.

12. Висушування осаду при температурі 65 °С протягом 5 хв.

13. Додавання в пробірки 50 мкл ЕкстраГену™ при постійному перемішуванні останнього розчину.

14. Суспензування змісту пробірок на вортексі до отримання гомогенної суспензії та термостатування при температурі 65 °С протягом 5 хв.

15. Суспензування змісту пробірок та центрифугування протягом 1 хв при 10 000 об/хв.

16. Перенесення супернатанту до мікропробірок та зберігання при температурі -20 °С.

Поліморфізм 1-го екзону гена ADRB₂ визначали методом полімеразної ланцюгової реакції (PCR) з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP). Для цього ампліфікували ділянку промотора вказаного гена за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (sense) -5' GACAAGCTGAGTGTGCAGGAC 3' і зворотного (antisense) - 5' TGAAGTAGTTGGTGACCGTCTG 3'. Праймери було синтезовано фірмою "Metabion" (Німеччина). Для ампліфікації брали 50-100 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5-кратного PCR-буферу, 1,5 мМ сульфату магнію, 200 мкМ суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 15 рМ кожного з праймерів і 0,75 ОД Таq-полімерази ("Ферментас", Литва), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. PCR проводили в термоциклері GeneAmp PCR System 2700 ("Applied Biosystems", США). Ампліфікація фрагмента промотору складалася з 33 циклів: денатурація - 94 °С (50 с), гібридизація праймерів - 64,5 °С (45 с) і елонгація - 72 °С (1 хв). Потім 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37 °С протягом 20 годин з 3 ОД рестриктази Fnu4HI (SstI) ("Ферментас", Литва) у буфері NEBuffer4 такого складу: 20 мМ трис-ацетату (рН 7,9), 10 мМ ацетату магнію, 50 мМ ацетату калію, 1 тМ дитіотреїтолу.

Якщо в 79 позиції гена ADRB2 містився цитозин, ампліфікат, який складався з 369 пар основ, розщеплювався рестриктазою *SatI* на два фрагменти - 231 і 138 пар основ. У разі заміни цитозину на гуанін сайт рестрикції для *SatI* втрачався і утворювався один фрагмент розміром 369 пар основ. Ампліфікати після рестрикції розділяли в 2,5 % агарозному гелі, що містив 10

5

мкг/мл бромистого етидію. Горизонтальний електрофорез (ОДЗА; 200V) проводили протягом 20 хв. Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора ("Біоком", Росія).

Запропонованим способом було проведено обстеження 195 пацієнтів із верифікованим діагнозом БА (основою діагностики є рекомендації GINA (2011) та Наказ №868 МОЗ України від 08.10.2013 р.; оцінка контролю БА - на основі опитувальника ACQ-5 та за результатами

10

детального клініко-інструментального обстеження хворих), та 95 практично здорових осіб. Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою програми SPSS Statistics 21,0. Для порівняння розподілення частот генотипів між групами хворих та контролю використовували критерій χ^2 -Пірсона. Статистично достовірними вважали відмінності при $p < 0,05$.

15

Результати молекулярно-генетичного аналізу Gln27Glu поліморфізму гена ADRB2 в досліджуваних групах наведено в таблиці.

Таблиця

Рівень контролю Генотипи	Хворі на БА					
	Контрольована		Частково контрольована		Неконтрольована	
	n	%	n	%	n	%
Gln27Gln	63	61,8	30	29,4	9	8,8
		94,0		30,9		29,0
Gln27Glu	3	4,1	65	89,0	5	6,9
		4,4		67,0		16,1
Glu27Glu	1	5,0	2	10,0	17	85,0
		1,6		2,1		54,9
$\chi^2=88,4$ $p = 0,0001$						

Примітки:

n - кількість пацієнтів;

χ^2 - критерій узгодженості Пірсона;

p - показник вірогідності відмінностей.

20

Виявлено, що у хворих із контрольованою БА превалював Gln27Gln генотип (61,8 %), а у хворих із неконтрольованим перебігом - Glu27Glu генотип (54,9 %). З іншого боку, за наявності Gln27Gln генотипу контрольована БА була у 61,8 %, частково контрольована - у 29,4 %, неконтрольована - у 8,8 %; у носіїв Gln27Glu генотипу - у 4,1 %, 89 % та 6,9 % відповідно, а у носіїв Glu27Glu генотипу - у 5 %, 10 % та 85 % відповідно.

25

Ризик розвитку неконтрольованого перебігу у носіїв Glu алеля у 3,07 рази вищий, ніж у носіїв Gln алеля (ВШ = 3,07, 95 % ДІ 1,70-5,56; $p = 0,0002$), що свідчить про асоціацію із відсутністю контролю

30

Технічним результатом, що досягається запропонованим способом є прогнозування неконтрольованого перебігу БА у носіїв Gln алеля за Gln27Glu поліморфізмом гена ADRB₂, що дозволяє сформувати групи ризику щодо даного захворювання.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

35

Спосіб прогнозування неконтрольованого перебігу бронхіальної астми, що включає виділення геномної ДНК з біологічного матеріалу з наступним виявленням поліморфізму гена та визначення за наявності патологічного генотипу рівня контролю бронхіальної астми (БА), який **відрізняється** тим, що як біологічний матеріал для виділення геномної ДНК використовують венозну кров хворих, а виявлення поліморфізму генів здійснюють відносно гена ADRB₂ методом полімеразної ланцюгової реакції, і для визначення патологічного генотипу ураховують наявність Glu алеля за Gln27Glu поліморфізмом гена ADRB₂, за результатом якого у хворих прогнозують неконтрольований перебіг БА.

40

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601