



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **113107** (13) **U**  
(51) МПК (2016.01)  
**G01N 33/00**

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: <b>u 2016 07479</b>	(72) Винахідник(и): <b>Банадига Наталія Василівна (UA),</b> <b>Волошин Станіслава Богданівна (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>08.07.2016</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>10.01.2017</b>	(73) Власник(и): <b>Банадига Наталія Василівна,</b> вул. Виговського, 40, м. Тернопіль, 46009 (UA), <b>Волошин Станіслава Богданівна,</b> вул. Чубинського, 23, с. Підгороднє, Тернопільський р-н, Тернопільська обл., 47737 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.01.2017, Бюл.№ 1</b>	

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ІНДИВІДУАЛЬНОЇ ЧУТЛИВОСТІ ДО ЗАСТОСУВАННЯ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ПРИ ЗАГОСТРЕННІ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ У ДІТЕЙ

### (57) Реферат:

Спосіб визначення індивідуальної чутливості до застосування лікарських засобів при загостренні бронхіальної астми у дітей включає молекулярно-генетичне дослідження. Додатково проводять визначення поліморфних варіантів Arg16Gly гена  $\beta_2$ -адренорецепторів і за даними, отриманими в результаті проведеного дослідження, свідчать про генетично обумовлену залежність дебюту хвороби, важкість її перебігу, індивідуальну чутливість  $\beta_2$ -адренорецепторів до лікарських засобів невідкладної допомоги та здійснюють оцінку ефективності їх застосування, і в разі, коли виявляють гетерозиготний варіант Arg/Gly генотипу, свідчать про вищу індивідуальну чутливість хворого до лікарського засобу сальбутамолу і роблять висновок про ефективність його застосування, а при виявленні гомозиготного варіанту Gly/Gly генотипу свідчать про вищу індивідуальну чутливість хворого до комбінованої інгаляційної терапії (іпратропію бромід/фенотеролу) і роблять висновок про ефективність її застосування для надання невідкладної терапії.

UA 113107 U



Корисна модель належить до медицини, зокрема до пульмонології та алергології, і може бути використана для визначення індивідуальної чутливості до лікарських засобів у стадії загострення бронхіальної астми у дітей із різними фенотипами для своєчасного надання їм невідкладної терапії при нападах ядухи.

Відомий спосіб визначення індивідуальної чутливості до лікарських засобів при загостренні бронхіальної астми у дітей, що включає молекулярно-генетичне дослідження [1]. За відомим способом визначення генетичних маркерів здійснюють шляхом дослідження, виділення та очистки ДНК методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Недоліком відомого способу є недостатній рівень клінічної інформативності та ефективності, що впливає з обмеженого забезпечення диференційованого підходу для надання невідкладної терапії дітям, хворим на бронхіальну астму, через відсутність повноти достовірної інформації, яка відображає особливості етіологічних факторів, патогенетичних механізмів розвитку хвороби, ступеня тяжкості і прогнозування її клінічного перебігу. За відомим способом не вдається в достатній мірі забезпечити визначення індивідуальної чутливості до лікарських засобів, яка б дозволила достовірно вказати на індивідуалізацію застосування інгаляційних бронходилататорів (інгаляційних глюкокортикостероїдів), у стадії загострення бронхіальної астми у дітей із різними фенотипами для того, щоб надати їм своєчасну невідкладну терапію при нападах ядухи.

В основу корисної моделі поставлена задача вдосконалити відомий спосіб, в якому шляхом зміни технологічного прийому, спрямованого на визначення поліморфних варіантів Arg16Gly гена  $\beta_2$ -адренорецепторів, що дозволяє швидко купувати напади ядухи у дітей, хворих на бронхіальну астму у групах пацієнтів із різними фенотипами бронхіальної астми і забезпечує диференційований підхід для надання невідкладної терапії в період загострення бронхіальної астми з визначенням та врахуванням індивідуальної чутливості дитини до лікарських засобів, досягають підвищення інформативності молекулярно-генетичних досліджень, а отже, підвищення клінічної ефективності способу в цілому.

Для вирішення поставленої задачі до уваги було взято те, що бронхіальна астма є мультифакторіальним захворюванням, в основі якого лежить сукупність генетичної схильності пацієнта та впливу факторів навколишнього середовища. На формування фенотипу захворювання впливає наявність генетичної схильності та несприятливих факторів зовнішнього середовища. Проте, генетично детермінованими можуть бути наступні варіанти: схильність людини до гіперпродукції IgE, гіперреактивності бронхів або до алергічних захворювань у цілому. Ось чому, надзвичайно важливим є "генетичне" здоров'я батьків дитини та їх близьких родичів, оскільки за наявності атопічної патології за обома лініями спадковості частота захворюваності зростає, а дебют хвороби припадає на перші роки життя дитини.

Беручи до уваги те, що генетичні фактори відіграють важливу роль у виникненні будь-якої хвороби і визначають стан здоров'я людини у відсотковому еквіваленті, то саме у випадку із захворюванням на бронхіальну астму відсоток значущості генетичної детермінанти зростає разом із зростанням відсотка значущості ролі впливу несприятливих чинників зовнішнього середовища та способу життя пацієнта. Як результат, підвищеного інтересу у науковців викликає дослідження поліморфних варіантів ADR $\beta_2$  гена  $\beta_2$ -адренорецепторів, які є важливими у виникненні бронхіальної астми, а у подальшому для визначення індивідуальної чутливості пацієнта до лікарських засобів при наданні невідкладної терапії.

Серед великої кількості поліморфних варіантів гена ADR $\beta_2$  найчастіше досліджують генотип Arg16Gly, через виявлення поліморфізмів, що змінюють функціональні особливості рецептора, асоційовані з фенотипами астми та ефективністю застосування невідкладної терапії  $\beta_2$ -агоністами. Саме тому, встановлення ролі генетичних маркерів може суттєво послужити у подальшому для формування профілактичних заходів та персоналізації лікування, а отже, забезпечити диференційований підхід для надання невідкладної терапії хворій на бронхіальну астму дитині, не залежно від ступеня тяжкості хвороби в стадії загострення. Застосування комбінованої терапії, що включає інгаляційні кортикостероїди та  $\beta_2$ -агоністи пролонгованої дії, призводить до досягнення та підтримки контролю перебігу хвороби, зникнення симптомів, зменшення частоти загострень і потреби в симптоматичній терапії  $\beta_2$ -агоністами короткої дії, а відтак, нормалізації вентиляційної функції легень. Завдяки визначеній індивідуальній чутливості організму, запропонований нами спосіб забезпечить персоналізацію показання до призначення спеціальної невідкладної терапії, що у свою чергу призведе до уникнення надмірного медикаментозного навантаження та захистить організм пацієнта від алергізації, виникнення побічних дій та ускладнень, призведе стан хворого до його нормалізації, а отже, до покращення якості життя пацієнта в цілому.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб визначення індивідуальної чутливості до застосування лікарських засобів при загостренні бронхіальної астми у дітей, що включає молекулярно-генетичне дослідження, який відрізняється тим, що додатково проводять визначення поліморфних варіантів Arg16Gly гена  $\beta_2$ -адренорецепторів і за даними, отриманими в результаті проведеного дослідження свідчать про генетично обумовлену залежність дебюту хвороби, важкість її перебігу, індивідуальну чутливість  $\beta_2$ -адренорецепторів до лікарських засобів невідкладної допомоги та здійснюють оцінку ефективності їх застосування, і в разі, коли виявляють гетерозиготний варіант Arg/Gly генотипу, свідчать про вищу індивідуальну чутливість хворого до лікарського засобу сальбутамолу і роблять висновок про ефективність його застосування, а при виявленні гомозиготного варіанту Gly/Gly генотипу свідчать про вищу індивідуальну чутливість хворого до комбінованої інгаляційної терапії (іпратропію бромід/фенотеролу) і роблять висновок про ефективність її застосування для надання невідкладної терапії.

Конкретно спосіб здійснюють таким чином.

Перед призначенням невідкладної терапії дитині, хворій на бронхіальну астму, проводять визначення індивідуальної чутливості пацієнта до лікарських засобів шляхом проведення молекулярно-генетичного дослідження.

У дитини, натщесерце, здійснюють забір крові з ліктьової вени в кількості 1 мл. Використовуючи комерційну тест-систему "innuPREP Blood DNA Mini Kit" за допомогою центрифужних фільтрів, з периферійної крові виділяють геномну ДНК для молекулярно-генетичного дослідження. Для визначення поліморфних варіантів гена  $\beta_2$ -адренорецепторів (Arg16Gly) rs 1042713 використовують модифіковані протоколи з олігонуклеотидними праймерами з використанням методу ПЛР. Після цього, здійснюють аналіз поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ), а досліджувані ділянки гена ампліфікують за допомогою специфічних праймерів ("Metabion", Німеччина) [2]. Рестрикцію геномної ДНК проводять в мікротермостаті при температурі 37 °C впродовж 12 годин. Реакцію зупиняють підвищенням температури до 65 °C впродовж 20 хвилин. Стан ампліфікаційних фрагментів аналізують в 3 % агарозному гелі (агароза фірми "Thermo Scientific", США), з додаванням бромистого етидію, маркера молекулярної ваги GeneRuler 50 bp DNA Ladder ("Thermo Scientific", США) та подальшою візуалізацією за допомогою комп'ютерної програми Vitran. Візуалізацію отриманих результатів здійснюють в транслюмінаторі. У процесі проведення дослідження визначають індивідуальну чутливість пацієнта до сальбутамолу та комбінованої інгаляційної терапії (іпратропію бромід/фенотеролу). По отриманих значеннях свідчать про вищу індивідуальну чутливість до конкретного лікарського засобу чи комплексу лікарських засобів, роблять висновок про ефективність їх призначення та застосування як невідкладної терапії при загостренні бронхіальної астми у дітей. Отже, при виявленні гетерозиготного варіанту Arg/Gly генотипу свідчать про вищу індивідуальну чутливість пацієнта до сальбутамолу і призначають його для надання невідкладної терапії. Проте, по мірі зростання тяжкості перебігу хвороби збільшується частота виявлення гомозиготного варіанту Gly/Gly генотипу гена  $\text{ADR}\beta_2$  і, при його виявленні, свідчать про вищу індивідуальну чутливість пацієнта до комбінованої інгаляційної терапії (іпратропію бромід/фенотеролу) і роблять висновок про ефективність її застосування для надання невідкладної терапії.

Приклад 1. Дівчинка К., 6 років, перебувала на стаціонарному лікуванні у пульмонологічному відділенні з діагнозом бронхіальної астми (на яку хворіє з раннього дитячого віку), із середньотяжким персистуючим перебігом, загостренням тяжкого ступеня. Пацієнтка була госпіталізована зі скаргами на напади малопродуктивного кашлю, задишку, відчуття свисту в грудній клітці. Дівчинка була обстежена в приступному періоді бронхіальної астми. До призначення невідкладної терапії, хворій зроблено визначення індивідуальної чутливості до лікарських засобів. У дитини, натщесерце, здійснили забір крові з ліктьової вени в кількості 1 мл. Використовуючи комерційну тест-систему "innuPREP Blood DNA Mini Kit" за допомогою центрифужних фільтрів, з периферійної крові виділили геномну ДНК для молекулярно-генетичного дослідження. Для визначення поліморфних варіантів гена  $\beta_2$ -адренорецепторів (Arg16Gly) rs 1042713 використовували модифіковані протоколи з олігонуклеотидними праймерами з використанням методу ПЛР. Після цього, здійснили аналіз поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ), а досліджувані ділянки гена ампліфікували за допомогою специфічних праймерів ("Metabion", Німеччина). Рестрикцію геномної ДНК проводили в мікротермостаті при температурі 37 °C впродовж 12 годин. Реакцію зупиняли підвищенням температури до 65 °C впродовж 20 хвилин. Стан ампліфікаційних фрагментів аналізували в 3 % агарозному гелі (агароза фірми "Thermo Scientific", США), з додаванням бромистого етидію, маркера молекулярної ваги GeneRuler 50 bp DNA Ladder ("Thermo Scientific", США) та здійснили

подальшу візуалізацією отриманих результатів в транслюмінаторі за допомогою комп'ютерної програми Vitran. За результатами проведеного молекулярно-генетичного дослідження геномної ДНК, було виявлено гомозиготний варіант Gly/Gly генотипу  $\beta_2$ -адренорецепторів. Отриманні результати підтвердили вищу індивідуальну чутливість пацієнтки до комбінованої інгаляційної терапії (іпратропію бромід/фенотеролу). Це дало підстави свідчити про вищу індивідуальну чутливість пацієнтки до комбінованої інгаляційної терапії (іпратропію бромід/фенотеролу) і зробити висновок про ефективність її застосування для надання невідкладної терапії. Завдяки вчасному призначенню та проведеному лікуванню пацієнтки, що отримувала адекватну бронходилатуючу терапію, вдалось швидко купувати приступ бронхообструкції. Таким чином, призначення комбінованої бронходилатуючої терапії (іпратропію бромід фенотеролу) хворій К. можна визнати ефективним.

Приклад 2. Запропонованим способом здійснювали визначення поліморфних варіантів генотипу Arg16Gly гена  $\beta_2$ -адренорецепторів у крові 91 пацієнта. В обстежених хворих дітей, для надання невідкладної терапії, у 61 випадку використовувався сальбутамол, а у 30 хворих - комбінований інгаляційний бронходилататор. Серед пацієнтів, в яких напади ядухи куповано сальбутамолом, у 50,82 % визначався гетерозиготний варіант Arg/Gly генотипу, а серед дітей, із вищою індивідуальною чутливістю до іпратропію бромід/фенотеролу, у 60,00 % спостерігався гомозиготний варіант Gly/Gly генотипу гена  $\beta_2$ -адренорецепторів.

Отже, використання способу визначення індивідуальної чутливості пацієнтів до застосування лікарських засобів при загостренні бронхіальної астми у дітей, що заявляється, дає змогу індивідуалізувати лікувальну тактику. Переваги запропонованого способу, полягають також у тому, що він є високоінформативний, підвищує достовірність вибору лікарських засобів для надання невідкладної терапії з урахуванням індивідуальних особливостей і чутливості пацієнта до них. Перераховані переваги визначають перспективність застосування способу в пульмонології та алергології для індивідуалізації терапії, дозволяє підвищити точність вибору лікарських засобів ефективною та своєчасною невідкладною терапією хворим дітям із різними фенотипами, у стадії загострення бронхіальної астми, зокрема при нападах ядухи.

Таким чином, запропонований спосіб забезпечує вищу, ніж за відомим способом клінічну ефективність, і може бути використаний у клінічній пульмонології.

Джерела інформації:

1. Пат. 73570 UA. Спосіб діагностики генетичних маркерів у дітей з бронхіальною астмою / Литвинець Л.Я. - № u2012 04088 від 03.04.2012; опубл. 25.09.2012; Бюл. № 18.

2. Carroll C.L., Stoltz P., Schramm C.M., Zucker A.R. (2009)  $\beta_2$ -adrenergic receptor polymorphisms affect response to treatment in children with severe asthma exacerbations. Chest, vol. 135, no. 5, pp. 1186-1192.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення індивідуальної чутливості до застосування лікарських засобів при загостренні бронхіальної астми у дітей, що включає молекулярно-генетичне дослідження, який **відрізняється** тим, що додатково проводять визначення поліморфних варіантів Arg16Gly гена  $\beta_2$ -адренорецепторів і за даними, отриманими в результаті проведеного дослідження, свідчать про генетично обумовлену залежність дебюту хвороби, важкість її перебігу, індивідуальну чутливість  $\beta_2$ -адренорецепторів до лікарських засобів невідкладної допомоги та здійснюють оцінку ефективності їх застосування, і в разі, коли виявляють гетерозиготний варіант Arg/Gly генотипу, свідчать про вищу індивідуальну чутливість хворого до лікарського засобу сальбутамолу і роблять висновок про ефективність його застосування, а при виявленні гомозиготного варіанту Gly/Gly генотипу свідчать про вищу індивідуальну чутливість хворого до комбінованої інгаляційної терапії (іпратропію бромід/фенотеролу) і роблять висновок про ефективність її застосування для надання невідкладної терапії.