



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **114303**

(13) **U**

(51) МПК

G01N 33/50 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2016 07824**

(22) Дата подання заявки: **15.07.2016**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.03.2017**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.03.2017, Бюл.№ 5**

(72) Винахідник(и):

**Іващук Сергій Іванович (UA),
Сидорчук Лариса Петрівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ
ЗАКЛАД УКРАЇНИ "БУКОВИНСЬКИЙ
ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ",
пл. Театральна, 2, м. Чернівці, 58002 (UA)**

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ПЕРЕБІГУ ПАНКРЕАТИТУ ЗА ПОЛІМОРФІЗМОМ ГЕНА CFTR (delF508)

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування перебігу панкреатиту за поліморфізмом гена CFTR (delF508) шляхом визначення поліморфізму певного кандидатного гена з використанням полімеразної ланцюгової реакції. Визначають поліморфізм delF508 гена трансмембранного регуляторного білка муковісцидозу CFTR, використовують як показник лабораторного контролю клінічного перебігу панкреатиту рівень тригліцеридів крові хворого. Наявність NN-генотипу є сприятливим прогностичним критерієм перебігу панкреатиту, а верифікація NM- і MM-генотипів є прогностично несприятливими маркерами.

UA 114303 U

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме до хірургії, і може бути використана для прогнозування перебігу гострого чи загострення хронічного панкреатиту.

Гострий панкреатит (ГП) і загострення хронічного панкреатиту (ЗХП) є серйозною проблемою для лікарів багатьох спеціальностей, оскільки посідає третє місце серед невідкладної абдомінальної патології. Вивченню цієї патології приділялося і приділяється багато уваги, особливо, враховуючи багатофакторність у виникненні і перебігу цієї патології. Питання прогнозу перебігу ГП чи ЗХП є актуальним для вибору адекватної терапії на початковому етапі чи, тим паче, з позиції хірургічного лікування. На сьогоднішній день не існує високоспецифічних методів прогнозування важкості перебігу панкреатиту, що зумовлено відмінністю етіологічних чинників, недосконалістю чи відсутністю чітких лабораторних критеріїв, внаслідок взаємного впливу різних органів і систем людського організму. Неправильна оцінка важкості перебігу панкреатиту зазвичай пов'язана з неадекватним лікуванням і в наступному призводить до гірших результатів лікування хворих з даною патологією. Виходячи зі сказаного вище, даний спосіб спрямований на розробку нового специфічного способу прогнозування перебігу ГП і ЗХП та виникнення ускладнень.

Найближчим аналогом до запропонованої корисної моделі є спосіб прогнозування перебігу гострого панкреатиту та розвитку його ускладнень (Патент України № 68121 МПК А61В 5/00. Спосіб прогнозування перебігу гострого панкреатиту та розвитку його ускладнень / Полянський І.Ю., Максим'юк В.В.; Власник Полянський І.Ю., Максим'юк В.В. - заяв. № u201111832 від 07.10.2011; опубл. 12.03.2012, Бюл. № 5.), в якому визначають поліморфізм R122H гена синтезу катіонічного трипсिनогену (PRSS1), який знаходиться на третьому екзоні 7-ої хромосоми, для цього проводять вивчення алелів поліморфних ділянок третього екзону гена PRSS1 шляхом виділення геномної ДНК з лейкоцитів периферійної крові, стабілізованої ЕДТА як антикоагулянт ("Merk®", Німеччина), із наступною ампліфікацією поліморфної ділянки за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) на програмованому ампліфікаторі "Amply-4L" (Росія), з індивідуальною температурною програмою для специфічних праймерів: sense (5'-GGTCCTGGGTCTCATACCTT-3'), antisense (5'-GGGTAGGAGGC TTCACACTT-3').

Для дискримінації мутаційного H122 алеля гена PRSS1 використовують ендонуклеазу рестрикції Af1III, згідно з інструкціями ("Fermentas®", Німеччина). Продукти ПЛР аналізують за допомогою електрофорезу в 3 % агарозному гелі в присутності трисборатного буфера, концентрованого з бромідометидію. Фрагменти візуалізують за допомогою УФ-випромінювача в присутності маркера молекулярних мас 100-1000 бп ("СибЭнзим", Росія).

У результаті проведення ПЛР можливе визначення наступних варіантів поліморфізму R122H гена PRSS1: R122R-генотип, K122H-генотип і H122H-генотип. Враховуючи аутосомно-домінантний тип успадкування мутації R122H гена PRSS1, наявність R122R-генотипу є сприятливим прогностичним критерієм перебігу гострого панкреатиту, а верифікація R122H- і H122H-генотипів - прогностично несприятливим маркерами.

Автори вказують на те, що у патогенезі гострого панкреатиту важливе значення має внутрішньоацинарна активація панкреатичних ензимів з розвитком швидкого поширення деструктивного ураження підшлункової залози. А у носіїв патологічного H-алеля поліморфізму R122H гена PRSS1 спостерігається більш інтенсивна внутрішньоацинарна активація панкреатичних ферментів та швидше поширення деструктивних процесів підшлункової залози. Це дає авторам підстави оцінювати наявність патологічного H-алеля (тобто R122H і H122H-генотипи), як прогностично несприятливого маркера клінічного перебігу гострого панкреатиту, що потребує застосування більш активної лікувальної тактики у цих хворих.

Недоліками найближчого аналога є наступні: попри те, що внутрішньоацинарна активація панкреатичних ферментів є однією з основних ланок патогенетичного механізму розвитку гострого панкреатиту, проте вона може бути проконтрольована тільки опосередковано, до того ж один і той же, за важкістю, клінічний стан може проявитися як гіперферментемією, так і гіпоферментемією, та й активності ферментів притаманна певна залежність від функціонального стану інших органів і систем. У найближчому аналозі не враховується стан ліпідного спектра крові хворих на гострий панкреатит. Так, ліпідна тріада: підвищення рівня ліпопротеїдів дуже низької щільності (ЛПДНЩ) або тригліцеридів (ТГ), атерогенних ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ) та зниження ліпопротеїдів високої щільності (ЛПВЩ), лежить в основі патогенезу багатьох захворювань і оксидативного стресу в цілому. Відомо, що до 40 % хворих на гострий панкреатит мають гіпертригліцеридемію, особливо хіломікронемію. Зростання тригліцеридів за гострого панкреатиту є показником важкого перебігу, до того ж зростання тригліцеридів може саме по собі спровокувати виникнення гострого панкреатиту. Вважається, що вільні жирні кислоти, які вивільняються з тригліцеридів під впливом ліпази, потрапляючи в мікроциркуляторне русло підшлункової залози, уражають дрібні судини і

зумовлюють ішемічне ураження її паренхіми. Тому, імовірним вважається механізм автолізу тканини підшлункової залози внаслідок активації трипсиногену ацидозом, виникнення якого зумовлене пошкодженням вільними жирними кислотами клітинних мембран.

В основу корисної моделі поставлена задача вдосконалити спосіб прогнозування перебігу гострого панкреатиту і розвитку його ускладнень шляхом визначення поліморфізму delF508 гена трансмембранного регуляторного білка муковісцидозу CFTR, використання як показника лабораторного контролю клінічного перебігу панкреатиту рівня тригліцеридів крові хворого; наявність NN-генотипу є сприятливим прогностичним критерієм перебігу панкреатиту, а верифікація NM- і MM-генотипів є прогностично несприятливими маркерами.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі прогнозування перебігу панкреатиту за поліморфізмом гена CFTR (delF508) шляхом визначення поліморфізму певного кандидатного гена з використанням полімеразної ланцюгової реакції, згідно з корисною моделлю, визначають поліморфізм delF508 гена трансмембранного регуляторного білка муковісцидозу CFTR, використовують як показник лабораторного контролю клінічного перебігу панкреатиту рівень тригліцеридів крові хворого; наявність NN-генотипу є сприятливим прогностичним критерієм перебігу панкреатиту, а верифікація NM- і MM-генотипів є прогностично несприятливими маркерами.

Спільними ознаками найближчого аналога і запропонованої корисної моделі є те, що визначають поліморфізм певного кандидатного гена з використанням полімеразної ланцюгової реакції.

Відмінні ознаки корисної моделі від прототипу наведені в наступній таблиці.

Таблиця

Порівняння корисної моделі та найближчого аналога за ознаками

Ознака	Корисна модель	Найближчий аналог
Визначають поліморфізм гена	delF508 гена трансмембранного регуляторного білка муковісцидозу CFTR	R122H гена синтезу катіонного трипсиногена PRSS1
Показник лабораторного контролю клінічного перебігу панкреатиту	рівень тригліцеридів крові хворого (зміни ліпідного спектру крові рівнонаправлено корелюють зі змінами зі сторони підшлункової залози)	внутрішньоацинарна активація ферментів (ферментемія може як зростати, так і зменшуватися за погіршення перебігу панкреатиту)
Прогнозування перебігу гострого панкреатиту і розвитку його ускладнень	наявність NN-генотипу є сприятливим прогностичним критерієм, а верифікація NM- і MM-генотипів є прогностично несприятливими маркерами	наявність патологічного H-алеля (тобто R122H і H122H-генотипи) є прогностично несприятливим маркером

Визначення термінів, які використовуються при описі корисної моделі: поліморфізм, ген, CFTR (delF508C), тригліцериди крові.

Спосіб здійснюють наступним чином.

Геномну ДНК виділяють з лейкоцитів периферійної крові за допомогою комерційної тест-системи "inpuPREPBloodDNAMiniKit" (AnalytikJena, Німеччина) та використовують центрифужні фільтри. Поліморфні варіанти гена CFTR (rs 113993960) визначають, керуючись протоколом із олігонуклеотидними праймерами із використанням методу алель-специфічної ПЛР. Ампліфікацію досліджуваних ділянок гена проводять із застосуванням специфічних праймерів ("Metabion", Німеччина) (GGCACCATTAAAGAAAATATCATCTT forward (wild), GGCACCATTAAAGAAAATATCATTGG forward (mutation), CATTACAGTAGCTTACCCA-reverse (common)); для фрагментів гена CFTR (delF508) використовують комерційний набір MasterMixPCR (фірми "NEOGEN", Україна).

Стан ампліфікаційних фрагментів CFTR (delF508) аналізують в агарозному гелі фірми "CleaverScientific" (Великобританія), з додаванням бромистого етидію, маркера молекулярної ваги GeneRuler 50 bpDNA Ladder ("ThermoScientific", США) та візуалізують в транслюмінаторі за допомогою комп'ютерної програми Vitran.

У результаті проведення ПЛР визначають наступні варіанти поліморфізму delF508 гена CFTR: NN-генотип, NM-генотип і MM-генотип. Наявність NN-генотипу є сприятливим прогностичним критерієм перебігу панкреатиту, а верифікація NM- і MM-генотипів є прогностично несприятливими маркерами.

Приклад практичного застосування корисної моделі.

Спосіб прогнозування перебігу панкреатиту за поліморфізмом гена CFTR (delF508) апробований у клінічних умовах. У дослідженні взяли участь хворі на гострий і загострення хронічного панкреатиту у кількості 101 особа, яким за допомогою полімеразної ланцюгової реакції було проведено генетичний аналіз.

За результатами дослідження встановлено, що у хворих на гострий і загострення хронічного панкреатиту за поліморфізму гена CFTR (delF508C) спостерігається відмінність у рівнях тригліцеридів (ТГ) залежно від NN чи NM-генотипу. Так за дикого, сприятливого NN-генотипу середній рівень ТГ склав $1,54 \pm 0,12$, тоді, як за NM-генотипу - $2,15 \pm 0,08$ ($p_{NN} < 0,01$). Також рівень ТГ за NM-генотипу вірогідно відрізнявся ($p_k < 0,01$) і від показників контролю (референтних значень: $1,37 \pm 0,18$, тоді як за NN-генотипу вірогідної різниці з референтними значеннями не було. Важчий перебіг за NM-генотипу гена CFTR підтверджувався клінічно (частіше виникнення ускладнень, триваліший період лікування) та лабораторно, за вираженою активацією клітинної і гуморальної ланок імунітету. А от щодо рівнів ферментів, що відображають стан ураження тканини підшлункової залози, то вони у носіїв NM-генотипу гена CFTR не завжди реагували відповідно до змін підшлункової залози. Тобто, заявлений спосіб дає вірогідніший прогноз перебігу панкреатиту, у порівнянні з прототипом, оскільки підтверджується рівнем тригліцеридів крові, які більш чутливо і однозначно реагують на зміни зі сторони підшлункової залози і, відповідно, тісно пов'язані з динамікою запального процесу.

Порівняльний аналіз найближчого аналога і запропонованого способу виявив високу прогностичну цінність останнього, що ґрунтується на поліморфізмі гена CFTR (delF508) та підтверджується рівнем тригліцеридів крові.

Технічний результат.

Запропонований спосіб дозволяє ефективно прогнозувати перебіг панкреатиту за поліморфізмом гена CFTR (delF508), виявити серед загальної когорти хворих тих, у кого захворювання матиме важчий перебіг і з вищим ризиком розвитку ускладнень; впровадження запропонованого способу забезпечить внесення відповідних змін в комплекс лікувальних заходів і поліпшить результати лікування хворих на гострий і загострення хронічного панкреатиту.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозування перебігу панкреатиту за поліморфізмом гена CFTR (delF508) шляхом визначення поліморфізму певного кандидатного гена з використанням полімеразної ланцюгової реакції, який **відрізняється** тим, що визначають поліморфізм delF508 гена трансмембранного регуляторного білка муковісцидозу CFTR, використовують як показник лабораторного контролю клінічного перебігу панкреатиту рівень тригліцеридів крові хворого; наявність NN-генотипу є сприятливим прогностичним критерієм перебігу панкреатиту, а верифікація NM- і MM-генотипів є прогностично несприятливими маркерами.

Комп'ютерна верстка Т. Вахричева

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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