



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **41212** (13) **U**
(51) МПК (2009)
A61B 6/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ЗНИЖЕНОЇ ЩІЛЬНОСТІ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ (ЩКТ) У ЖІНОК**

1

2

(21) u200814442

(22) 15.12.2008

(24) 12.05.2009

(46) 12.05.2009, Бюл.№ 9, 2009 р.

(72) ПОВОРОЗНЮК ВЛАДИСЛАВ ВОЛОДИМИРОВИЧ, UA, БУТЕНКО ГЕННАДІЙ МИХАЙЛОВИЧ, UA, ПІШЕЛЬ ІРИНА МИКОЛАЇВНА, UA, ГРИГОР'ЄВА НАТАЛІЯ ВІКТОРІВНА, UA, ЄВТУШЕНКО ОЛЬГА ОЛЕКСАНДРІВНА, UA, ЛЕОНОВ ЮРІЙ ІГОРОВИЧ, UA

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ГЕРОНТОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ", UA

(57) Спосіб прогнозування зниженої щільності кісткової тканини (ЩКТ) у жінок, який передбачає забір біологічного матеріалу (крові, слини, зішкрябків чи мазків) та його дослідження, який **відрізняється** тим, що з біологічного матеріалу виділяють ДНК та визначають наявність точкових мутацій гена інтерлейкіну 10 (Іл-10) за допомогою застосування методу полімеразної ланцюгової реакції з використанням праймерів, які визначають наявність мутації (-1082 A/G), і при наявності генотипу AA прогнозують зниження щільності кісткової тканини.

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме ортопедії, і може бути використана при прогнозуванні ризику виникнення остеопорозу та його ускладнень у жінок.

Згідно світової статистики, ризик виникнення переломів є однією з основних проблем стану здоров'я людини. Головною причиною виникнення переломів є остеопороз. У світі кількість хворих на остеопороз складає більше 240 мільйонів, основна частина з яких - жінки постменопаузального періоду. Основна відмінність остеопорозу від інших захворювань - майже повна відсутність клінічних проявів безпосередньо до виникнення переломів кісток. Тому проблема ранньої діагностики розвитку остеопорозу є дуже актуальною. Встановлено, що ризик виникнення переломів тісно пов'язаний зі щільністю кісткової тканини (ЩКТ). На сьогодні для визначення ЩКТ застосовують методи рентгеноабсорбціометрії та кількісної ультразвукової денситометрії, проведення яких можливе лише у великих спеціалізованих центрах. Існуючі в нашій країні методи визначення ЩКТ не дають можливості проведення широкого диспансерного обстеження населення, тому залишається актуальною проблема ранньої діагностики захворювання.

Відомо кілька аналогічних способів визначення груп пацієнтів із ризиком зниження ЩКТ. Спосіб «Методи ідентифікації ризику наявності низької ЩКТ та можливості її корекції» (аплікаційна форма патенту США №20070292849, МПК - C12Q1/68, дата публікації 20.12.2007) який ґрунтується на визначенні ризику наявності низької ЩКТ. Спосіб передбачає виділення ДНК (дезоксирибонуклеїно-

вої кислоти) із тканин пацієнта та визначення поліморфізму геному у зоні SEQ ID NOs: 1-5. При наявності або відсутності одного чи декількох варіантів поліморфізму, пов'язаних зі зниженою ЩКТ, роблять висновок про підвищений ризик наявності низької щільності кісткової тканини у пацієнта.

Спосіб дозволяє проводити діагностику серед загальної популяції людей, але не гарантує визначення вірогідного ризику у групи пацієнтів з низькою щільністю кісткової тканини в українській популяції.

Спосіб «Поліморфізм гену c1sn7 як генетичний маркер щільності кісткової тканини» (аплікаційна форма патенту США №10/535914, МПК A61B5/05, дата публікації 17.08.2006). Спосіб ґрунтується на визначенні специфічних точкових мутацій гену c1sn7, які пов'язані з підвищеним ризиком наявності низької ЩКТ.

Спосіб дає змогу проводити діагностування станів ЩКТ у популяції людей, які проживають в США, включаючи вплив екологічних факторів, особливостей харчування, та інших факторів.

Спосіб «Маркери, які пов'язані з ризиком виникнення остеопорозу, та методи їх використання» (аплікаційна форма патенту США №11/703400, МПК C12Q1/68; G01N33/53; G06F19/00, дата публікації 17.07.2008). Спосіб ґрунтується на визначенні рівня певних біологічних маркерів, які пов'язані з ризиком виникнення остеопорозу, остеопенії або ризику переломів у пацієнтів. Визначається ефективна кількість одного чи більше остеоризик-маркерів, обраних серед інших, які тісно пов'язані з ризиком виникнення остеопорозу (всього заяв-

(13) **U**(11) **41212**(19) **UA**

лено 191 маркер, серед них Іл-10), з використанням біохімічних методів ІФА (імуноферментного аналізу) або методів визначення кількості РНК (рибонуклеїнової кислоти).

Спосіб дозволяє проводити діагностування загальної популяції людей, але передбачає використання досить дорогих тест-систем, більшість з яких не доступні в Україні.

Завданням даної корисної моделі є створення способу прогнозування ризику наявності низької ЩКТ за рахунок виділення та дослідження ДНК з біологічного матеріалу (крові, слини, зішкрябів чи мазків), визначення наявності точкових мутацій гену інтерлейкіну 10 (-1082 A/G), і при наявності генотипу AA прогнозуєть ризик наявності низької ЩКТ, і забезпечують можливість раннього (в молодому віці) прогнозу виникнення остеопорозу у жінок, що дозволить завчасне застосування попереджувальних заходів.

Спосіб здійснюється наступним чином:

1. Відбираємо у пацієнта біологічний матеріал (кров / слина / зішкрябі / мазки).

2. Виділення ДНК проводимо з допомогою набору „ДНК-сорб-В” (фірми АмплиСенс, Росія).

- у пробірки з лізуючим розчином вносимо по 100мкл проби;

- проби ретельно змішуємо на вортексі та прогріваємо 5хв. при 65°C. Центрифугуємо 5с при 5 тис. об./хв.;

- ретельно ресуспендуємо сорбент на вортексі. В кожну пробірку додаємо по 25мкл ресуспендованого сорбенту, змішуємо на вортексі, залишаємо у штативі на 2хв., ще раз змішуємо і залишаємо у штативі на 5хв.;

- осаджуємо сорбент центрифугуванням при 5 тис. об./хв. протягом 30с, видаляємо супернатант;

- додаємо в проби по 300мкл розчину для відмивання 1, змішуємо на вортексі до повного ресуспендування сорбенту. Осаджуємо сорбент центрифугуванням при 5 тис. об./хв. протягом 30с. Видаляємо супернатант;

- додаємо в проби по 500мкл розчину для відмивання 2, змішуємо на вортексі до повного ресуспендування сорбенту, центрифугуємо 30с при 10 тис. об./хв. Видаляємо супернатант. Процедуру повторюємо;

- поміщаємо пробірки в термостат при 65°C на 5-10хв. для підсихання сорбенту;

- в пробірки додаємо по 50мкл ТЕ-буфера для елюції ДНК, змішуємо на вортексі, ставимо в термостат при 65°C на 5хв., періодично струшуємо;

- центрифугуємо пробірки при 12 тис. об./хв. протягом 1хв.

Супернатант містить очищену ДНК, проби готові для постановки ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції).

3. Постановка ПЛР:

- готуємо реакційну суміш для ПЛР, виходячи з необхідного числа реакцій, додаємо реагенти в наступному порядку: вода, буфер для ПЛР, розчин dNTP (100мМ), ДНК-полімераза Taq (5u/мкл), праймер (Іл-10 С: 5'-CTT GGA TTA AAT TGG CCT TAG A; Іл-10 F: 5'-ACT ACT AAG GCT TCT TTG GGA A; Іл-10 R: 5'-CTA CTA AGG CTT CTT TGG GAG).

- в пронумеровані пробірки наливаємо по 15мкл реакційної суміші і 1 краплі мінеральної олії;

- додаємо зразок ДНК і закриваємо пробірки.

- центрифугуємо пробірки протягом 10с, щоб шар води опинився під олією.

- пробірки ставимо до ампліфікатора та встановлюємо програму роботи:

96°C – 1хв.

96°C – 15с	} 10 циклів
65°C – 50с	
72°C – 40с	

96°C – 10с	} 20 циклів
60°C – 50с	
72°C – 40с	

4. Аналіз отриманих продуктів проводимо з допомогою електрофорезу в 1,5% агарозному гелі з бромистим етідієм. Електрофорез проводимо в 1х TBE (трисбейс-ЕДТА) буфері при 200В, 80мА, протягом 15хв.

5. Після проведення електрофорезу гель розміщуємо на робочій поверхні транслюмінатора, закриваємо темною камерою з фотоапаратом і фотографуємо гель.

6. Аналізуємо отримані результати. При наявності генотипу AA робимо висновок про ризик виникнення у пацієнта зниженої ЩКТ.

Новим в способі є те, що з біологічного матеріалу (крові, слини, зішкрябів чи мазків) виділяють ДНК та визначають наявність точкових мутацій гену Іл-10 за допомогою застосування методу полімеразної ланцюгової реакції з використанням специфічних праймерів, які визначають наявність мутації (-1082 A/G), і дають можливість (при наявності мутації) віднесення пацієнта до групи ризику виникнення остеопорозу на ранньому етапі.

Здійснення запропонованого способу не пов'язане із травмуванням пацієнта, проведення дослідження можливе після транспортування біологічних зразків до діагностичних центрів на великій відстані й не потребує транспортування або присутності пацієнта під час проведення генотипування.

Спосіб, що заявляється, ілюструється прикладами.

Приклад 1. Жінка 30 років. При проведенні дослідження виявлено генотип AA, що свідчить про високу ймовірність наявності низької щільності кісткової тканини ($P < 0,001$ стосовно інших можливих варіантів генотипів). Необхідне призначення більш детального медичного огляду спеціалістом ортопедом та, в разі підтвердження діагнозу, проведення курсу превентивного лікування для попередження розвитку захворювання.

Приклад 2. Дівчинка 8 років. При проведенні дослідження виявлено генотип AA, що свідчить про високу ймовірність наявності низької щільності кісткової тканини. Необхідно звернути увагу батьків на потребу у підвищеній фізичній активності дитини, та на необхідність спеціального харчування, яке забезпечить достатній розвиток скелета в період активного росту дитини.

Всього генотипуванню для перевірки способу

було піддано 144 особи - 32 практично здорові, 76 - з остеопенією, та 35 - з остеопорозом, у яких визначали щільність кісткової тканини з використанням рентгенологічної денситометрії.

При здійсненні способу використано реактиви виробництва фірми "Fermentas".

Як показують результати проведених досліджень, внаслідок застосування запропонованого способу забезпечується можливість прогнозувати ризик наявності низької щільності кісткової тканини на ранніх етапах.