



УКРАЇНА

(19) UA (11) 41814 (13) U
(51) МПК (2009)
A61B 6/00
G01N 33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ РИЗИКУ ВИНИКНЕННЯ ПЕРЕЛОМІВ

1

(21) u200815220

(22) 29.12.2008

(24) 10.06.2009

(46) 10.06.2009, Бюл.№ 11, 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

2

(57) Спосіб прогнозування ризику виникнення переломів, 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 генів рецептора естрогену ER1 та вітаміну D VDR за допомогою застосування методу полімеразної ланцюгової реакції та наступною обробкою продуктів ампліфікації специфічними ендонуклеазами XbaI та BsmI (відповідно), і при наявності комбінації генотипу bbXX прогнозують ризик виникнення переломів кісток.

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме ортопедії, і може бути використана при прогнозуванні для визначення ризику виникнення переломів.

Згідно світової статистики, ризик виникнення переломів є однією з основних проблем стану здоров'я людини. Основний фактор виникнення переломів - остеопороз. Кількість хворих на остеопороз складає більше 240 мільйонів у світі, 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 захворювання є дуже актуальною. Встановлено, що ризик виникнення переломів тісно пов'язаний зі щільністю кісткової тканини (ЩКТ). Визначення ЩКТ у теперішній час можливе при застосуванні методів рентгено-абсорбціометрії та кількісної ультразвукової денситометрії, що можливо лише у великих спеціалізованих центрах. Існуючі в країні методи визначення ризику виникнення переломів не дають можливості проведення широкого диспансерного обстеження населення, тому проблема прогнозування захворювання залишається досить актуальною.

Відомо кілька аналогічних способів визначення ризику виникнення переломів. Спосіб «Алелі гену рецептору естрогену, які є маркерами підвищеного ризику виникнення переломів» (патент США

№7354712 МПК - C12Q 1/68; C12P 19/34, дата публікації 15.09.2005), який ґрунтується на визначенні підвищеного ризику виникнення переломів у ссавців. Спосіб передбачає визначення алелей гену рецептору естрогену альфа Р, р, Х або х. При наявності алелей р або х роблять висновок про підвищений ризик виникнення переломів у ссавців. Спосіб є інформативним у відношенні до загальної популяції ссавців і не гарантує визначення вірогідного ризику виникнення переломів у людини.

Спосіб «Спосіб діагностики остеопорозу та/або прогнозування ризику виникнення переломів, які пов'язані з остеопорозом. ЕППЛАЙД СЕЛЛ БАЙО-ТЕКНОЛОДЖИЗ, ИНК. (JP)» (Патент Росії №2003110428/15, МПК C12Q1/48, дата публікації 27.08.2004). Спосіб передбачає визначення щільності кісткової тканини шляхом визначення вмісту сечової γ -GTP (маркер кругообігу кісткової тканини). Спосіб є тривалішим у виконанні та передбачає використання досить дорогих тест-систем, більшість з яких не доступні в Україні.

Найближчим прототипом є спосіб «Метод визначення чутливості до пошкодження кісток за допомогою скринінгу поліморфізмів гену рецептору вітаміну Д» (патент США №6803197, МПК C12Q1/68; C07H21/04; C12Q1/68; C07H21/02; C12P19/34, дата публікації 10.12.2004). Спосіб ґрунтується на визначенні точкових мутацій гену рецептору вітаміну Д, які пов'язані з підвищеним ризиком виникнення переломів. Спосіб передба-

U
(13)
41814
(11)
UA
(19)

чає визначення алелей гену рецептору вітаміну Д В/b, A/a або T/t з використанням специфічних ендонуклеаз BsmI, ApaI та TaqI, відповідно. При наявності специфічної комбінації алелей baT роблять висновок про підвищений ризик виникнення переломів. Спосіб передбачає визначення трьох алелей гену, що ускладнює процес дослідження та ідентифікації результатів, й на 30% дорожче від запропонованого способу.

Завданням даної корисної моделі є створення способу прогнозування ризику виникнення переломів за рахунок виділення та дослідження ДНК з біологічного матеріалу (крові, слини, зішкрябів чи мазків), визначення наявності точкових мутацій гену рецептору естрогену ER1 та вітаміну Д VDR, і при наявності генотипу bbXX робиться висновок про належність обстежуваного пацієнта до групи ризику виникнення переломів, що забезпечує можливість раннього (в молодому віці) прогнозу та дозволяє завчасне застосування попереджувальних заходів.

Спосіб здійснюється наступним чином:

1. Відбирають у пацієнта біологічний матеріал (кров / слина / зішкряби / мазки).

2. Виділення ДНК проводять з допомогою набору "ДНК-сорб-В" (фірми АмплиСенс, Росія).

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

- проби ретельно змішують на вортексі та прогрівають 5хв. при 65°C. Відцентрифугувати 5с при 5тис. об./хв. на мікроцентрифузі;

- ретельно ресуспендують сорбент універсальний на вортексі. У кожену пробірку додають по 25мкл ресуспендованого сорбенту, змішують на вортексі, залишають у штативі на 2хв., ще раз змішують і залишають у штативі на 5хв.;

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

- додають в проби по 300мкл розчину для відмивання 1, змішують на вортексі до повного ресуспендування сорбенту. Осаджують сорбент центрифугуванням при 5тис. об./хв. протягом 30с. Видаляють супернатант;

- додають в проби по 500мкл розчину для відмивання 2, змішують на вортексі до повного ресуспендування сорбенту, центрифугують 30с при 10тис. об./хв. Видаляють супернатант. Процедуру повторюють;

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

- в пробірку додають по 50мкл ТЕ-буфера для елюції ДНК, змішують на вортексі, ставлять в термостат при 65°C на 5хв., періодично струшуючи;

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

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

3. Постановка ПЛР:

- готують реакційну суміш для ПЛР, виходячи з необхідного числа реакцій, додаючи реагенти в наступному порядку: вода, буфер для ПЛР, розчин dNTP (100мМ), ДНК-полімераза Taq (5у/мкл), праймер (ER F: 5'-ATC CAG GGT TAT GTG GCA

ATG AC-3'; ER R: 5'-ACC CTG GCG TCGATTATC TGA-3' або VDR (bsm) F: 5'-CAA CCA AGA CTC AAG TAC CGC GTC AGT GA-3'; VDR (bsm) R: 5'-AAC CAG CGG AAG AGG TCA AGG G-3').

- у пронумеровані пробірки наливають по 15мкл реакційної суміші, 1 краплі мінеральної олії;

- додають зразок ДНК і закривають пробірки.

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

- пробірки ставлять до ампліфікатора та встановлюють програму роботи:

Для ER1

95 °C – 5 хв

94 °C – 30 с

57 °C – 40 с

72 °C – 30 с

30 циклів

Для VDR

95 °C – 5 хв

94 °C – 30 с

65 °C – 30 с

72 °C – 30 с

30 циклів

4. Обробка ендонуклеазами.

- готують реакційну суміш, виходячи з необхідного числа реакцій, додаючи реагенти в наступному порядку: вода, буфер ендонуклеази XbaI або BsmI;

- в пронумеровані пробірки наливають по 5мкл реакційної суміші, 1 краплі мінеральної олії.

- додають відповідні продукти ампліфікації і закривають пробірки.

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

- інкубуємо при 37°C протягом 16 годин.

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

6. Після проведення електрофорезу гель розміщують на робочій поверхні транслюмінатора, закривають темною камерою з фотоапаратом і фотографують гель.

7. Аналіз отриманих результатів. При наявності генотипу bbXX робимо висновок про ризик виникнення у пацієнта переломів.

Новим у способі є те, що з біологічного матеріалу (крові, слини, зішкрябів чи мазків) виділяють ДНК та визначають наявність точкових мутацій генів рецептору естрогену ER1 та вітаміну Д VDR за допомогою застосування методу полімеразної ланцюгової реакції та наступною обробкою продуктів ампліфікації специфічною ендонуклеазою XbaI та BsmI (відповідно), і при наявності генотипу bbXX роблять висновок про належність досліджуваного пацієнта до групи ризику виникнення переломів. Внаслідок застосування способу забезпечується можливість віднесення пацієнта до групи ризику на ранньому етапі, спосіб гарантує визначення групи ризику саме для української популяції.

Здійснення запропонованого способу не пов'язано з травмуванням пацієнта, проведення дослідження можливе після транспортування зразків крові до діагностичних центрів на далекій відстані, і не потребує транспортування або присутності пацієнта під час проведення генотипування.

Спосіб, що заявляється, ілюструється прикладом.

Приклад 1. Жінка 45 років. Діагноз остеопенія. При проведенні дослідження виявлено генотип bbXX. Ризик виникнення переломів у цій групі жінок складає 50% ($P < 0,003$ по відношенню до інших можливих варіантів генотипів). При призначенні курсу лікування пацієнтку слід віднести до групи хворих на остеопороз з відповідними призначеннями. При укладанні страхового полісу слід зважати на високий ризик виникнення переломів.

Приклад 2. Дівчинка віком 5 років. При проведенні дослідження виявлено генотип bbXX. Ризик

виникнення переломів у цій групі складає 50% ($P < 0,003$ по відношенню до інших можливих варіантів генотипів). При спілкуванні з батьками слід зазначити, що дитину слід утримувати від участі у спортивних секціях, які пов'язані з високою частотою падінь або травмувань. При укладанні страхового полісу слід зважати на високий ризик виникнення переломів.

Всього генотипуванню для перевірки способу було піддано 125 осіб - 46 з наявністю переломів в анамнезі, та 79 - без наявності, 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 виникнення переломів на ранніх етапах.