



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **111454** (13) **C2**
(51) МПК
G01N 33/48 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21)	Номер заявки:	а 2015 05925	(56)	Перелік документів, взятих до уваги експертизою: UA 69439 U, 25.04.2012 UA 49910 U, 11.05.2010 RU 2398230 C1, 27.08.2010 RU 2406447 C2, 20.12.2010 Alamelu Raja. Immunology of tuberculosis. Indian J. Med. Res., October 2004, pages 213 - 232 Бутов Д.О. Зміни показників цитокінів під впливом поліморфізму генів IL-2, IL-4 та IL-10 у хворих на туберкульоз при хіміотерапії. Annals. Of Mechnikov Institute. - 2014. - № 2. - С. 74 - 78 Мезенцева М.В. и др. Цитокины как маркеры развития инфильтративного туберкулеза легких // Инфекция и иммунитет. - Т. 1. - 2011. - № 4. - С. 367- 372 Разнатовська О.М. Взаємозв'язок деяких цитокінів і функціонального стану печінки у хворих на хіміорезистентний туберкульоз легень // Укр. наук.-мед. молодіжн. журнал. -2013. - № 2. - С. 43-44 Гематологические лейкоцитарные индексы у больных химиорезистентным туберкулезом легких в зависимости от клинической формы / Разнатовская Е.Н. // Газета "Новости медицины и фармации" Аллергология и пульмонология (480). - 2013. - тематический номер. 2013. - С. 37281 Оцінка стану імунної системи у хворих на хіміорезистентний туберкульоз легень залежно від клінічної форми / Разнатовська О.М. // Здоровье ребенка (5). - 2013. - № 48. - С. 36713 Чурина Е. Г. Роль регуляторных т-клеток в иммунопатогенезе туберкулеза легких с множественной лекарственной устойчивостью: автореферат дис. ... доктора медицинских наук: 14.03.03 / Чурина Елена Георгиевна; Сибирский государственный медицинский университет.- Томск, 2012. - 45 с. Бутов Д.О. Динаміка імунологічних гострофазових показників крові у хворих з рецидивом туберкульозу легень у процесі лікування/Д. О. Бутов // Туберкульоз. Легеневі хвороби. ВІЛ-інфекція. - К.: ТОВ "ВІТ-А-ПОЛ", 2013. - № 3. - С. 28-32 Чернушенко Е.Ф. и др. Цитокины в оценке иммунной системы у больных туберкулезом легких // Украинский пульмонологический журнал. - 2010. - № 2. - С. 39-43
(22)	Дата подання заявки:	15.06.2015		
(24)	Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.04.2016		
(41)	Публікація відомостей про заявку:	26.10.2015, Бюл.№ 20		
(46)	Публікація відомостей про видачу патенту:	25.04.2016, Бюл.№ 8		
(72)	Винахідник(и):	Бутов Дмитро Олександрович (UA), Степонецко Ганна Леонідівна (UA)		
(73)	Власник(и):	ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, пр. Леніна, 4, м. Харків, 61022 (UA)		
(74)	Представник:	Євтушенко Тамара Григорівна		

(54) СПОСІБ ГЕНЕТИЧНОГО ПРОГНОЗУВАННЯ ТУБЕРКУЛЬОЗУ ЛЕГЕНЬ

(57) Реферат:

Винахід стосується способу генетичного прогнозування туберкульозу легень, який передбачає виявлення поліморфізмів генів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з наступним виявленням прогностичного генотипу, згідно з винаходом, дезоксирибонуклеїнову кислоту виділяють з лейкоцитів цільної венозної крові з наступним визначенням поліморфізмів T330G

UA 111454 C2

гена інтерлейкіну-2, С589Т гена інтерлейкіну-4, G1082А гена інтерлейкіну-10 та С3872Т гена С-реактивного білка і при наявності мутаційної гомозиготи та/або гетерозиготного генотипу у двох та більше перерахованих поліморфізмах генів прогнозують ризик розвитку туберкульозу легень.

Винахід належить до медицини, а саме до фтизіатрії, і може бути використаний для генетичного прогнозування туберкульозу легень.

Вплив спадковості на туберкульоз було встановлено при дослідженні монозиготних і дизиготних близнюків. Таким чином було доведено генетичний зв'язок, який вказував, що генетика може грати певну роль в сприйнятливості до туберкульозної інфекції. Саме генетичне прогнозування туберкульозу може допомогти виявити групи ризику на туберкульоз та установити діагноз у хворих з цією недугою у тяжких випадках діагностики. Даний спосіб може бути використаний в клінічній практиці для генетичного прогнозування туберкульозу на ранніх стадіях, що, у свою чергу, дасть можливість поставити вірний діагноз хворому та призначити адекватну терапію, щоб запобігти розповсюдженню специфічного процесу та попередити можливі ускладнення від туберкульозу. Крім того, даний спосіб допоможе виявити групу ризику серед людей, які більш схильні до розвитку туберкульозного процесу та проводити саме даному контингенту профілактичний огляд (флюорографія органів грудної клітки), а тим, хто не має даної ознаки, не проводити. Т.ч. даний спосіб знизить економічні затрати на профілактичні огляди з приводу туберкульозу та зменшить радіологічне навантаження на інших людей, які не включені у групу ризику.

На сьогоднішній день є декілька способів генетичного прогнозування туберкульозу легень у людини.

Так, наприклад, відомий спосіб генетичного діагностування туберкульозу легень, який включає молекулярне типування гена за допомогою полімеразної ланцюгової реакції і при виявленні у генотипі алелі HLA-DQB1*05 прогнозує ризик розвитку туберкульозу органів та несприятливий його перебіг [Пат. № 2406447 RU, МПК А61В10/00, С12Q1/68. Способ генетического прогнозирования туберкулеза органов дыхания / Арчакова Л.И., Павлова М.В., Павлова И.Е., Бубнова Л.И.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное учреждение "Санкт-Петербургский научно- исследовательский институт фтизиопульмонологии Федерального агентства по высокотехнологической медицинской помощи". - З. № 2009105576/14; заяв. 17.02.2009; опубл. 20.12.2010].

Даний спосіб генетичного прогнозування туберкульозу легень є найбільш близьким до того, що заявляється, за технічною суттю та результатом, який може бути досягнутим, тому його вибрано як прототип.

В основу винаходу поставлено задачу розширення арсеналу способів генетичного прогнозування туберкульозу легень.

Задачу, яку поставлено в основу винаходу, вирішують тим, що у відомому способі генетичного прогнозування туберкульозу легень, який включає виявлення поліморфізмів генів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з наступним виявленням прогностичного генотипу, згідно з винаходом, дезоксирибонуклеїнову кислоту (ДНК) виділяють з лейкоцитів цільної венозної крові з наступним визначенням поліморфізмів Т330G гена інтерлейкіну-2 (ІЛ-2), С589Т гена інтерлейкіну-4 (ІЛ-4), G1082A гена інтерлейкіну-10 (ІЛ-10) та С3872Т гена С-реактивного білка (СРБ) і при наявності мутаційної гомозиготи та/або гетерозиготного генотипу у двох та більше перерахованих поліморфізмах генів прогнозує ризик розвитку туберкульозу легень.

Технічний ефект винаходу обумовлений тим, що активація поліморфізмів Т330G гена ІЛ-2, С589Т гена ІЛ-4, G1082A гена ІЛ-10 та С3872Т гена СРБ впливає на вироблення відповідних біологічно активних речовин, які, у свою чергу, належать до медіаторів з прозапальним та протизапальним механізмом дії та визначають характер та направленість імунної відповіді організму.

Спосіб виконують наступним чином: виділення ДНК проводять з цільної венозної крові (2,0 мл), яку збирають в суху стерильну пробірку типу Еппендорфф з 0,2 мл антикоагулянту (0,05 М розчин етилендіамінтетраоцтової кислоти). Проби зберігають при температурі -20 °С до 6 міс. Для виділення ДНК пробірку розморожують при кімнатній температурі, кров перемішують до однорідності. У суху пробірку Еппендорфф вносять 0,5 мл розмороженої крові і додають 0,5 мл реактиву "ДНК-ЕКСПРЕС-КРОВ" (набір фірми "Літех" (Росія)). Вміст пробірки ретельно перемішують на вортексі і центрифугують 2 хв. при 2000 об/хв. Потім проби поміщають в сухоповітряний термостат і прогрівають 15 хв. при температурі 99 °С. Після цього проби центрифугують в високошвидкісній центрифугі при 12000 об/хв. при кімнатній температурі. Отриманий супернатант (надосадова рідина) відбирають у сухі чисті пробірки типу Еппендорфф місткістю 0,5 мл і використовують як досліджуваний зразок ДНК. Проведення полімеразної ланцюгової реакції для виявлення поліморфізмів у геномі людини за допомогою набору фірми "Літех" (Росія) гена ІЛ-2 (Т330G), гена ІЛ-4 (С589Т), гена ІЛ-10 (G1082A) та гена СРБ (С3872Т) проводять зі зразками виділеної ДНК. Паралельно проводять дві реакції ампліфікації - з двома

парами алель-специфічних праймерів. Результати аналізу дозволяють дати три типи висновків: нормальна гомозигота, гетерозигота і мутантна гомозигота. При наявності мутаційної гомозиготи та/або гетерозиготного генотипу у двох та більше перерахованих поліморфізмах прогнозують ризик розвитку туберкульозу легень.

Ефективність способу ілюструють наступні приклади:

Приклад № 1. Хворий А., 41 рік, госпіталізований з діагнозом: ВДТБ (вперше діагностований туберкульоз) легень (інфільтративний), Дестр + (наявність деструкції), МБТ + (мікобактерії туберкульозу виявлені), М+ (позитивний результат дослідження мазка на кислотостійкі бактерії), МГ + (наявність ДНК МБТ у харкотинні), риф - (відсутність гена groV МБТ стійкості до рифампіцину) КО (культуральне дослідження не проводилось), резист 0 (резистентність не визначалась), гіст 0 (гістологічне дослідження не проводили), кат (категорія) 1, ког (когорта) 1.

Скарги: загальна слабкість, сухий кашель, підвищення температури тіла до 38,2 °С, задишка при фізичному навантаженні.

Об'єктивно: загальний стан хворого задовільний, температура тіла 37,8 °С. Аускультативно в легенях: під лопаткою з правої сторони сухі, одиночні хрипи.

Дані лабораторних і інструментальних методів обстеження:

При дослідженні харкотиння методом мікроскопії та генетичного дослідження на наявність ДНК МБТ - виявлені МБТ. Гена groV МБТ стійкості до рифампіцину не виявлено.

Рентгенологічне дослідження органів грудної клітини (ОГК): у зменшених в об'ємі легенях відмічаються вогнищеві тіні різних розмірів та інтенсивності, в верхній правій частці відмічається інфільтрація з порожниною розпаду на верхівки 1,2×1,1 см. Синуси вільні.

У першу добу перебування хворого у стаціонарі було проведено дослідження поліморфізмів генів біологічно активних речовин. Отримано наступні результати: поліморфізм Т330G гена ІЛ-2 (виявлений гомозиготний GG/мутаційний/генотип), С589Т гена ІЛ-4 (виявлений гетерозиготний СТ генотип), G1082A гена ІЛ-10 (виявлений гомозиготний AA/мутаційний/генотип) та С3872Т гена СРБ (виявлений гомозиготний ТТ/мутаційний/генотип). У хворого визначається, за даним дослідженням, туберкульоз легень. Туберкульоз легень у даного хворого підтверджено стандартними методами дослідження.

Приклад № 2. Здоровий донор Б., 38 років, без клініко-рентгенологічних симптомів туберкульозу.

Скарг не має.

Об'єктивно: загальний стан його задовільний, температура тіла 36,6 °С. Аускультативно в легенях: везикулярне дихання. Хрипів не має.

Дані лабораторних і інструментальних методів обстеження:

При дослідженні харкотиння методом мікроскопії та генетичного дослідження на наявність ДНК МБТ - не виявлені МБТ.

Рентгенологічне дослідження ОГК: легені без наявності патологічних змін. Серце у нормі.

Було проведено дослідження поліморфізмів генів біологічно активних речовин. Отримано наступні результати: поліморфізм Т330G гена ІЛ-2 (виявлений гомозиготний ТТ/нормальний/генотип), С589Т гена ІЛ-4 (виявлений гомозиготний ТТ/мутаційний/генотип), G1082A гена ІЛ-10 (виявлений гомозиготний GG/нормальний/генотип) та С3872Т гена СРБ (виявлений гомозиготний СС/нормальний/генотип). Реципієнт не входить до групи ризику специфічного процесу органів дихання та не хворий на туберкульоз легень. Туберкульоз легень у даної людини не підтверджений стандартними методами діагностики.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб генетичного прогнозування туберкульозу легень, який включає виявлення поліморфізмів генів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з наступним виявленням прогностичного генотипу, який **відрізняється** тим, що дезоксирибонуклеїнову кислоту виділяють з лейкоцитів цільної венозної крові з наступним визначенням поліморфізмів Т330G гена інтерлейкіну-2, С589Т гена інтерлейкіну-4, G1082A гена інтерлейкіну-10 та С3872Т гена С-реактивного білка і при наявності мутаційної гомозиготи та/або гетерозиготного генотипу у двох та більше перерахованих поліморфізмах генів прогнозують ризик розвитку туберкульозу легень.

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

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