



УКРАЇНА

(19) UA (11) 58647 (13) U
(51) МПК (2011.01)
G01N 33/50МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ГЕНЕТИЧНОЇ СХИЛЬНОСТІ ДО РОЗВИТКУ БАКТЕРІАЛЬНИХ ІНФЕКЦІЙ,
ЩО ПЕРЕДАЮТЬСЯ СТАТЕВИМ ШЛЯХОМ

1

2

(21) u201008818

(22) 15.07.2010

(24) 26.04.2011

(46) 26.04.2011, Бюл.№ 8, 2011 р.

(72) ІЗМАЙЛОВА ОЛЬГА ВІТАЛІЙВНА, ШЛИКОВА
ОКСАНА АНАТОЛІЙВНА, КАЙДАШЕВ ІГОР ПЕТ-
РОВИЧ(73) ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
УКРАЇНИ "УКРАЇНСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛО-
ГІЧНА АКАДЕМІЯ"(57) Спосіб прогнозування індивідуальної схильно-
сті до розвитку поширених уrogenітальних інфекцій

із урахуванням генотипу, що включає виявлення
однонуклеотидних поліморфізмів гена TLR2
Arg753Gln та гена TLR4 Asp299Gly, Thr399Ile ме-
тодом ПЛР і оцінку ризику розвитку поширених
урогенітальних інфекцій, який **відрізняється** тим,
що для підвищення ефективності діагностики інфі-
кованості збудниками захворювань, що переда-
ються статевим шляхом, як генетичні маркери ви-
користовували аналіз поліморфних ділянок генів
TLR2 Arg753Gln та TLR4 Asp299Gly, Thr399Ile ме-
тодом ПЛР.

Корисна модель, що заявляється, відноситься
до області біології та медицини і може бути вико-
ристана для виявлення осіб із генетично детермі-
нованим високим ризиком розвитку бактеріальних
інфекцій, що передаються статевим шляхом.

Хвороби, що передаються статевим шляхом,
відносяться до найбільш розповсюджених у світі
інфекційних захворювань, тому основним завдан-
ням науковців є вивчення впливу інфекцій, що пе-
редаються статевим шляхом, на стан імунної сис-
теми з метою удосконалення критеріїв їх
діагностики і лікування, пояснення молекулярної
природи схильності індивіда до розвитку імуноопе-
реджаного патологічного процесу.

Первинна проективна функція клітин системи
вродженого імунітету з наступною ініціацією адап-
тивного імунітету здійснюється завдяки Toll-
подібним рецепторам (TLRs). Функціональний по-
ліморфізм генів TLR, який обумовлений замінами
одиночних нуклеотидів, у деяких випадках викли-
кає порушення, що призводять до зміни протікання
захисних реакцій організму і визначають ризик
розвитку патології [Симбирцев А.С. Толл-белки:
специфические рецепторы неспецифического им-
мунитета // Иммунология. - 2005. - №6. - С.368-
377].

Відомо ряд способів прогнозування генетичної
схильності до хвороби Крона і виразкового коліту з
урахуванням поліморфізму генів [Deficient host-
bacteria interactions in inflammatory bowel disease?
The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299Gly
polymorphism is associated with Crohn's disease and

ulcerative colitis / D. Franchimont, S. Vermeire, H.
Housni [et al.] // Gut. - 2004. - Vol. 53 (7). - P.978-
992]. Є дані про асоціацію поліморфізмів генів
TLR2 і TLR4 із підвищеним ризиком розвитку раку
шийки матки [Impact of Toll-like receptors [TLR] 2 (-
196 to -174 del) and TLR 4 (Asp299Gly, Thr399Ile) in
cervical cancer susceptibility in North Indian women /
S.Pandey, R.D.Mittal, M. Srivastava [et al.] // Gynecol
Oncol. - 2009. - Vol. 114(3). - P. 501-505]. Також,
відомий спосіб на основі вивченої асоціації полі-
морфізмів TLR4 Asp299Gly і Thr399Ile із наявністю
у кров'яному руслі інфекції Candida Albicans [Toll-
like receptor 4 Asp299Gly/Thr399Ile polymorphisms
are a risk factor for Candida bloodstream infection / C
A. Van der Graaf, M.G.Netea, S.A.Morre [et al.] // Eur
Cytokine Netw. - 2006. - Vol. 17(1). - P. 29-34]. Вста-
новлений зв'язок із підвищеною частотою зустрі-
чаємості мутацій гену TLR4 Asp299Gly і Thr399Ile у
осіб із септичним шоком, що викликаний грамнега-
тивною інфекцією [Relevance of mutations in the
TLR4 receptor in patients with gram-negative septic
shock / Lorenz E., Mira J.P., Frees K.L., Schwartz
D.A. // Arch. Intern. Med. - 2002. - Vol.162. - P.1028-
1032]. Відомо про підвищений ризик розвитку гра-
мнегативного і гематогенного остеомієліту у осіб із
поліморфізмом гену TLR4 [The tlr4 (tlr4 Asp299Gly)
polymorphism is a risk factor for gram-negative and
haematogenous osteomyelitis / A. H. Montes, V.
Asensi, V. Alvarez [et al.] // J. Clin. Exp. Immunol. -
2006. - Vol. 143 (3). - P.404-413].

Найбільш близьким до заявленого способу є
спосіб діагностики збудників захворювань, що пе-

(13) U
(11) 58647
(19) UA

редаються статевим шляхом, методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у генітальних екскретатах та в тканині передміхурової залози, яка вилучена під час операції у хворих на доброякісну гіперплазію передміхурової залози. В основу цього способу покладено завдання підвищення ефективності діагностики інфікованості збудниками урогенітальних інфекцій у хворих на доброякісну гіперплазію передміхурової залози [Пат. 35799 Україна, МПК G01N33/569. Спосіб діагностики урогенітальних інфекцій у хворих на доброякісну гіперплазію передміхурової залози / Возіанов О.Ф., Пасєчніков С.П., Мітченко М.В., Грицай В.С.; заявник і власник ДУ «Інститут урології АМН України». - №u200804098; заявл. 01.04.08; опубл. 10.10.08, Бюл. №19/2008]. Суть цього способу полягає в тому, що за допомогою методу ПЛР виявляти наявність збудників захворювань, що передаються статевим шляхом (*Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*), у генітальних екскретатах (зіскрібок із сечівника і секрет передміхурової залози) та у видаленій під час операції тканині передміхурової залози у хворих на доброякісну гіперплазію передміхурової залози.

Проте, даний спосіб має недостатній ступінь ефективності прогнозування, оскільки не враховувалась генетична схильність до підвищеної сприйнятливості до збудників бактеріальних інфекцій, які передаються статевим шляхом, що обмежує можливість його використання в клінічній і профілактичній медицині.

В основу корисної моделі поставлено завдання розробити спосіб прогнозування індивідуальної схильності до розвитку поширених урогенітальних інфекцій із урахуванням генотипу.

Поставлене завдання вирішується шляхом створення способу діагностики генетичної схильності індивіда до інфікування бактеріальними інфекціями, які передаються статевим шляхом, що включає виявлення одонуклеотидних поліморфізмів гену TLR2 Arg753Gln та гену TLR4 Asp299Gly, Thr399Ile методом ПЛР і оцінці ризику розвитку поширених урогенітальних інфекцій, який відрізняється тим, що для підвищення ефективності діагностики інфікованості збудниками даних захворювань, у якості генетичних маркерів використовували аналіз поліморфних ділянок генів TLR2 Arg753Gln та TLR4 Asp299Gly/ Thr399Ile методом ПЛР.

Запропонований спосіб дозволяє прогнозувати індивідуальну схильність до інфікування збудниками поширених урогенітальних інфекцій із урахуванням генетичних маркерів ризику розвитку патології та індивідуальної імунної відповіді до бактеріальних компонентів захворювань.

Заявлений спосіб вирішується наступним чином:

Після проведеного детального збору анкетних даних, анамнезу, даних клінічного стану на час огляду і об'єктивних даних зі сторони різних органів та систем була сформована група популяційного контролю, до якої увійшли 299 практично здорових жителів Полтавської області врівноважених за статтю, віком від 19 до 62 років. Матеріалом для дослідження була периферична кров.

Групу хворих на урогенітальні інфекції склали 156 осіб, різного віку та статі. Матеріалом для дослідження був зіскріб епітеліальних клітин із уретри і цервікального каналу, який отримували за допомогою спеціальних одноразових стерильних урогенітальних зондів. Наявність інфекцій було діагностовано методом ПЛР, що виконувалась по стандартним методикам, регламентованим виробником тест-систем із використанням наборів реагентів для виявлення ДНК збудників *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma genitalium*, *Gardnerella vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* (НПФ «Литех», Москва). Із 156 інфікованих осіб були виявлені: 16 осіб із хламідіозом, 102 особи із уреаплазмозом, 4 - із мікоплазмозом, 9 - із гарднерельозом, 2 - трихомоніазом і 23 - із наявністю декількох інфекцій.

Для аналізу поліморфізму гену TLR2 Arg753Gln методом ПЛР на ампліфікаторі «Терцик» («ДНК-Технологія», Москва) були використані специфічні олігонуклеотидні праймери:

5'-GAGTGGTGCAAGTATGAAGCTGGA-3' та

5'-TCCCAACTAGACAAAGACTGGTCT-3'.

Ампліфікація проводилася за такою програмою: денатурація 94°C, 5хв., 1 цикл; 32 цикли: 94°C, 30сек., 62°C, 1хв., 72°C 1хв.; заключний цикл - 72°C 3хв. Зберігання при 10°C. Ідентифікацію поліморфного варіанту проводили методом рестрикційного аналізу з використанням ендонуклеази рестрикції Pst I (НВО «Сибензим», Новосибірськ). Продукти розщеплення поліморфної ділянки гену TLR2 Arg753Gln виявляли за допомогою електрофорезу в 3% агарозному гелі («Helikon», Москва) в 1×TBE (50мМ трис-Н₃ВО₃ та 2мМ ЕДТА, рН 8,0), забарвленому етидіумом бромідом, протягом 2 годин при напрузі 2В на 1 см гелю із подальшою візуалізацією результатів в УФ-світлі.

Поліморфну ділянку Asp299Gly гену TLR4 ампліфікували за допомогою методу ПЛР на ампліфікаторі «Терцик» («ДНК-Технологія», Москва) із використанням специфічних олігонуклеотидних праймерів:

5'-GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCCATG-3' та

5'-GATCAACTTCTGAAAAAGCATTCCCCAC-3' за

такою програмою: денатурація 94°C, 30сек., 52°C, 1хв., 72°C 1хв., 1 цикл; 30 циклів: 94°C, 30сек., 55°C, 30 сек., 72°C 30 сек.; заключний цикл - 72°C 5хв. Зберігання - 10°C. Поліморфний варіант ідентифікували за допомогою подальшого рестрикційного аналізу з використанням ендонуклеази рестрикції Nco I (НВО «Сибензим», Новосибірськ). Продукти розщеплення поліморфної ділянки гену TLR4 (Asp299Gly) виявляли за допомогою електрофорезу в 3% агарозному гелі («Helikon», Москва) в 1×TBE (50мМ трис-Н₃ВО₃ та 2мМ ЕДТА, рН 8,0) протягом 2 годин при напрузі 2В на 1см гелю. Гель забарвлювали етидіумом бромідом із подальшою візуалізацією результатів в УФ-світлі.

Генотипування гену TLR4 по поліморфізму Thr399Ile проводили за допомогою ПЛР. В якості специфічних олігонуклеотидних праймерів використали:

5'-GGTTGCTGTTCTCAAAGTGATTTTGGGAGAA-3'

та 5'-ACCTGAAGACTGGAGAGTGAGTTAAATGCT-

3'. Режим ампліфікації: денатурація 94°C - 5хв.; 30 циклів: 94°C, 30сек., 55 °C, 30сек., 72°C 30сек. Зберігання - 10°C. Для ідентифікації алелей проводили рестрикційний аналіз ампліконів за допомогою ендонуклеази рестрикції Msp I (НВО «Сибензим», Новосибірськ). Продукти рестрикції аналізували за допомогою електрофорезу в 3% агарозному гелі («Helikon», Москва) в 1×TBE (50мМ трис-Н₃ВО₃ та 2мМ ЕДТА, рН 8,0) протягом 2 годин при напрузі 2V на 1см гелю. Гель фарбували етидіумом бромідом із подальшою візуалізацією результатів в УФ-світлі.

Математичну обробку отриманих даних проводили з використанням програмного пакету «STATISTICA 7.0. for Windows» і електронних таблиць MS Excel. Статистично значимими вважали відмінності при $p < 0,05$. Для порівняння частот варіантів у незв'язаних групах вираховували відношення шансів (ВШ) із визначенням 95% довірливого інтервалу (ДІ).

Дані про частоту поліморфізму Arg753Gln гена TLR2 серед осіб полтавської популяції та у пацієнтів із бактеріальною інфекцією, що передається статевим шляхом, наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Розподіл частот генотипів і алелей поліморфізму гена TLR2 Arg753Gln серед осіб Полтавської популяції та хворих із урогенітальною інфекцією, % (n)

Генотип, алель	Група популяційного контролю (n=299)	Група хворих на урогенітальні інфекції (n=156)
GG	99,0 (296)	92,95 (145)
GA	1,0(3)	5,77(9)
AA	-	1,28(2)
G	95,5	95,8
A	0,5	4,2
χ^2 - Пірсона з поправкою Іейтса, df=1	7,8318	8,92
Значення G статистики (G)	0,04703	1,89642
Число ступенів свободи для G (V)	0,00601	0,2126
Критичний рівень значення G для $p=0,05$ ($\chi_a^2(v)$)	-4,48797	0,66763
Частота алелю (p)	0,995	0,958
Частота алелю (q)	0,005	0,042
Гетерозиготність, що спостерігається (Hobs)	0,01	0,0577
Очікувана гетерозиготність (Hexp)	0,01	0,0799
Нормоване відхилення Hobs від Hexp (коефіцієнт інбридингу популяції) (F)	-0,005	0,2776
Адекватне врахування рідкісних алелей (показник μ)	1,141	1,4
Частка рідкісних алелей (h)	0,429	0,3

Розподіл частот генотипів і алелей поліморфної ділянки Arg753Gln гена TLR2 у групі популяційного контролю виявився наступним: GG-99,0%, AG-1,0%, AA-0%; у групі хворих на урогенітальні інфекції - 92,95%, 5,77% і 1,28% відповідно. У той же час частота виявлення алелей майже не відрізнялась - у здоровій популяції алель G зустрічалася з частотою 95,5%, серед хворих -95,8%, тоді як

алель A у здорових зустрічалася з частотою 0,5%, а у хворих на урогенітальні інфекції - 4,2% (ВШ=7,49; ДІ=1,99-22,55; $p < 0,05$).

Оцінка відмінностей між частотою поліморфізму Asp299Gly гена TLR4 у осіб полтавської популяції та у пацієнтів із урогенітальною інфекцією наведена в таблиці 2.

Таблиця 2

Розподіл частот генотипів і алелей поліморфізму гена TLR4 Asp299Gly серед осіб Полтавської популяції та хворих із урогенітальною інфекцією, % (n)

Генотип, алель	Група популяційного контролю (n=299)	Група хворих на урогенітальні інфекції (n=156)
AA	87,29 (261)	79,49(124)
AG	10,71 (32)	15,38(24)
GG	2,0(6)	5,13 (8)
A	92,65	87,18
G	7,35	12,82
χ^2 - Пірсона з поправкою Іейтса, df=1	12,3879	13,9507
Значення G статистики (G)	15,54556	27,19134
Число ступенів свободи для G (V)	1,2549	1,94911
Критичний рівень значення G для $p=0,05$ ($\chi_a^2(v)$)	4,43526	5,92447

Продовження таблиці 2

Частота алелю (p)	0,926	0,872
Частота алелю (q)	0,074	0,128
Гетерозиготність, що спостерігається (Hobs)	0,107	0,1538
Очікувана гетерозиготність (Hex)	0,1363	0,2235
Нормоване відхилення Hobs від Hex (коефіцієнт інбридингу популяції) (F)	0,215	0,3118
Адекватне врахування рідкісних алелей (показник μ)	1,522	1,669
Частка рідкісних алелей (h)	0,239	0,166

Як видно із таблиці 2 «дикий тип» генотипу зустрічався у 87,29% осіб полтавської популяції та у 79,49% хворих із урогенітальною інфекцією. Частота генотипу AG серед осіб полтавської популяції і серед осіб із діагностованою урогенітальною інфекцією склала 10,71% та 15,38% відповідно. Гомозиготний генотип за мутантним алелем зустрічався у 2,0% жителів полтавської популяції та 5,13% хворих на бактеріальні інфекції, що передаються статевим шляхом. Відповідно частота мутантного алелю G склала 7,35% і 12,82% (ВШ=1,77; ДІ= 1,06-2,96; $p<0,05$).

Як показали проведені дослідження по визначенню частоти поліморфізму Thr399Ile гена TLR4 (табл. 3) частота гомозиготного генотипу за «диким» алелем у групі популяційного контролю склала 95,99%, у групі хворих -94,23%. Мутантний генотип ТТ частіше зустрічався у групі хворих на урогенітальні інфекції, ніж серед жителів полтавського регіону (1,28 і 0,33% відповідно). Частота мутантного алелю Т серед жителів Полтавської області склала 2,3% та серед хворих на поширені урогенітальні інфекції - 3,5% (ВШ=1,35; ДІ=0,58-3,2; $p=0,66$).

Таблиця 3

Розподіл частот генотипів і алелей поліморфізму гена TLR4 Thr399Ile серед осіб Полтавської популяції та хворих із урогенітальною інфекцією, % (n)

Генотип, алель	Група популяційного контролю (n=299)	Група хворих на урогенітальні інфекції (n=156)
СС	95,99 (286)	94,23 (147)
ст	3,68 (12)	4,49 (7)
ТТ	0,33 (1)	1,28(2)
с	97,7	96,5
т	2,3	3,5
χ^2 -Пірсона з поправкою Іейтса, df=1	2,2454	13,5692
Значення G статистики (G)	0,29114	2,07105
Число ступенів свободи для G (V)	0,12966	0,15263
Критичний рівень значення G для $p=0,05$ ($\chi^2(v)$)	-0,11673	0,13634
Частота алелю (p)	0,977	1,1965
Частота алелю (q)	0,023	0,035
Гетерозиготність, що спостерігається (Hobs)	0,0401	0,0449
Очікувана гетерозиготність (Hex)	0,0457	0,068
Нормоване відхилення Hobs від Hex (коефіцієнт інбридингу популяції) (F)	0,1223	0,3404
Адекватне врахування рідкісних алелей (показник μ)	1,302	1,369
Частка рідкісних алелей (h)	0,349	0,316

Позитивний результат від заявленого способу прогнозування генетичної схильності до розвитку бактеріальних інфекцій, що передаються статевим шляхом, полягає в можливості визначати високу сприйнятливості до інфекційних захворювань на

підставі визначення генетичних маркерів ризику розвитку патології, а саме наявності мутантних алелей генів TLR2 Arg753Gln та TLR4 Asp299Gly забезпечують підвищений ризик інфікування урогенітальними інфекціями.