



УКРАЇНА

(19) UA (11) 61802 (13) U
(51) МПК (2011.01)
A61B 10/00
G01N 33/536 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ГЕНЕТИЧНО ДЕТЕРМІНОВАНОЇ ТЯЖКОЇ АТОПІЧНОЇ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ У ДІТЕЙ З ДЕРМАТО-РЕСПІРАТОРНИМ СИНДРОМОМ

1

2

(21) u201101359

(22) 07.02.2011

(24) 25.07.2011

(46) 25.07.2011, Бюл.№ 14, 2011 р.

(72) ВОВК ЮЛІЯ ОЛЕКСАНДРІВНА, КАЙДАШЕВ
ІГОР ПЕТРОВИЧ, КРЮЧКО ТЕТЯНА ОЛЕКСАНД-
РІВНА, ТКАЧЕНКО ОЛЬГА ЯРОСЛАВІВНА

(73) ВОВК ЮЛІЯ ОЛЕКСАНДРІВНА, КАЙДАШЕВ
ІГОР ПЕТРОВИЧ, КРЮЧКО ТЕТЯНА ОЛЕКСАНД-
РІВНА, ТКАЧЕНКО ОЛЬГА ЯРОСЛАВІВНА

(57) Спосіб прогнозування генетично детермінова-
ної тяжкої бронхіальної астми у дітей із дермато-
респіраторним синдромом, що включає застосу-
вання полімеразної ланцюгової реакції, який **від-
різняється** тим, що розраховують ступінь ризику

реалізації бронхіальної астми у дітей за шкалою критеріїв тяжкості atopії шляхом присвоєння кож-
ному критерію оцінки від 0 до 2 балів, внесення
показників до розробленої таблиці, обробки і сис-
тематизації отриманих результатів, легкій формі
atopії відповідає оцінка від 0 до 5 балів, середньо-
тяжкій формі - 5-10 балів, тяжкій формі atopії -
більше 10 балів, додатково, дітям із тяжкою фор-
мою atopії, проводять полімеразну ланцюгову ре-
акцію для виявлення одиничного нуклеотидного
поліморфізму Asp299Gly гена Toll-подібного реце-
птора 4 (позиція 1187, rs4986790), виявлення але-
ля G TLR4 засвідчує та асоціюється з тяжким пе-
ребігом atopічної бронхіальної астми.

Запропонована корисна модель відноситься
до галузі медицини, а саме - до медичної генетики
та педіатрії, і може бути використана для прогно-
зування розвитку тяжкого перебігу бронхіальної
астми (БА) в дитячому віці.

Бронхіальна астма сьогодні розглядається як
проблема глобального масштабу. Частота захво-
рювання з кожним роком зростає, і особливо чітко
така тенденція прослідковується в педіатрії, і ста-
новить 5-10 % дитячого населення. Дослідження
останніх років свідчать про те, що бронхіальна
астма, яка розвивається у ранньому дитячому віці,
найбільш вірогідно, має спадкове походження.
Тому пошук інформативних генетичних маркерів,
які регулюють ключові ланки патогенезу хронічно-
го запального процесу дихальних шляхів, безсум-
нівно, залишаються одним із пріоритетних завдань
сучасної медицини, оскільки рання діагностика
генетично детермінованої БА визначає формуван-
ня груп ризику та ранній початок ефективної пер-
винної профілактики, сприяє зменшенню розпо-
всюдженості тяжких форм захворювання та
попередженню інвалідизації дитячого населення.

Відомі способи ранньої діагностики бронхіаль-
ної астми: Пат. 2120635 Российская Федерация,
МПК 6 G01N 33/53. Спосіб діагностики тяжелой

бронхиальной астмы / Туев А.В., Верихова Л.А.,
Мишланов В.Ю.; Пермская Государственная ме-
дицинская академия - № 95102703/14. заявл.
23.02.95. опубл. 20.10.98. Бюл. № 29.; Пат.
2275863 Российская Федерация, МПК A61B 10/00.
Способ прогнозирования риска возникновения
бронхиальной астмы / Углева Е.М., Разумовская
Т.С., Федосеев Г.Б.; заявитель и патентооблада-
тель Санкт-Петербург, медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова. - № 2004136347/14; заявл.
12.15.04; опубл. 05.10.06.

Найбільш близьким до запропонованого є спо-
сіб прогнозування бронхіальної астми із викорис-
танням полімеразної ланцюгової реакції, за допо-
могою якої виявляють поліморфізм генів
інтерлейкінів, T113M IL9; C-703T IL5; A-80G IL5RA;
G1972A IL5RB; G+717C та C-590T IL4; Q551R та
15 OV IL4RA) в популяціях різного расового та
етнічного складу. Методика ґрунтується на скринін-
говому виявленні поліморфнозмінених ділянок
ДНК, які впливають на формування схильності до
бронхіальної астми (Фрейдин М.Б. Роль генів ін-
терлейкінов і їх рецепторів в формуванні
предрасположенности к atopической бронхиаль-
ной астме: автореф. дис... на соискание ученой
степени кандидата биологических наук: 03.00.15 /

UA (11) 61802 (13) U

М.Б.Фрейдин. - Томск, 2001).

Проте, для практичної медицини, та, зокрема, педіатрії, даний спосіб має ряд недоліків, які обумовлені складністю та громіздкістю проведення обстежень, що вимагає значних фінансових затрат на дослідження «генетичних ансамблів», відсутністю чітких критеріїв для призначення подібної методики. Крім того, спосіб ранньої діагностики бронхіальної астми за рахунок виявлення поліморфізму генів інтерлейкінів, застосовувався лише щодо дорослих осіб. Відомості про інформативність даного методу серед дитячого населення відсутні, що вносить протиріччя в доцільність застосування подібного обстеження. Тому, призначення доклінічних профілактичних заходів залишаються емпіричними.

В основу корисної моделі поставлене завдання створити спосіб прогнозування генетично детермінованої atopічної бронхіальної астми у дітей з дермато-респіраторним синдромом шляхом удосконалення відомого, досягти визначення ризику реалізації БА з урахуванням шкали тяжкості atopії та забезпечити обґрунтованість призначення поглибленого генетичного дослідження поліморфізму гена Toll-подібного рецептора 4 (Asp299Gly), забезпечити раннє виявлення, швидку диференційну діагностику представленої патології.

Поставлену задачу вирішують створенням

способу прогнозування генетично детермінованої тяжкої бронхіальної астми у дітей із дермато-респіраторним синдромом, що включає застосування полімеразної ланцюгової реакції, в якому, згідно корисної моделі, розраховують ступінь ризику реалізації бронхіальної астми у дітей за шкалою критеріїв тяжкості atopії шляхом присвоєння кожному критерію оцінки від 0 до 2 балів, внесення показників до розробленої таблиці, обробки і систематизації отриманих результатів, легкій формі atopії відповідає оцінка від 0 до 5 балів, середньотяжкій формі - 5-10 балів, тяжкій формі atopії - більше 10 балів, додатково, дітям із тяжкою формою atopії, проводять полімеразну ланцюгову реакцію для виявлення одиничного нуклеотидного поліморфізму Asp299Gly гена Toll-подібного рецептора 4 (позиція 1187, rs4986790), виявлення алеля G TLR4 засвідчує та асоціюється з тяжким перебігом atopічної бронхіальної астми.

Запропонований спосіб здійснюють наступним чином: при клініко-генеалогічному обстеженні хворого із дермато-респіраторним синдромом визначали ступінь тяжкості atopії, який включає найбільш значимі ознаки доклінічної картини генетично детермінованої БА запропонованими критеріями: спадковість, супутня алергопатологія, спектр сенсibiliзації, лабораторні критерії. Всі отримані дані вносили в розроблену таблицю.

Таблиця

Шкала тяжкості atopії

Критерії	Оцінка критерію в балах при його наявності	загальна оцінка (бал)
Спадковість		
по материнській лінії	2	6,5
по батьківській лінії	1	
мати	1	
батько	1	
дядько, тітка	0,5	
брати, сестри	0,5	
бабуся, дідусь	0,5	
вік матері на час вагітності більше 30р.	0,5	2,5
ускладнений перебіг вагітності	1	
пасивне паління в сім'ї	1	
Супутня алергопатологія		
Алергічний діатез в анамнезі	0,5	4,0
стенозуючий ларинготрахеїт на 1 році	0,5	
атопічний дерматит	1	
алергічний риніт	2	
Спектр сенсibiliзації:		
побутові алергени	2	5,5
епідермальні алергени	1,5	
пилкові алергени	1	
грибкові алергени	0,5	
харчові алергени	0,5	
Лабораторні критерії		
Підвищений загальний Ig E	1	1,5
Стійка еозинофілія крові	0,5	

Запропонована шкала дає можливість визначити ступінь ризику реалізації бронхіальної астми: сума балів від 1 до 5 - визначена як легка форма atopії та сумнівний ризик реалізації патології, 5-10 - середньотяжка та низький ризик, відповідно, більше 10 балів - тяжка atopія та потенційний ризик реалізації БА.

Запропонована шкала тяжкості atopії дає можливість сформувати групу дітей із потенційним ризиком реалізації тяжких форм БА, які підлягають поглибленому генетичному дослідженню, а саме, поліморфізму гена TLR4 Asp299Gly. Матеріал для дослідження - венозна периферична кров. Геномну ДНК виділяли за допомогою набору "ДНК-експрес". Поліморфізм гена TLR4 Asp299Gly визначали застосовуючи полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) з використанням специфічних олігонуклеотидних праймерів. Для ідентифікації алелів проводили рестрикційний аналіз ампліконів за допомогою ендонуклеази рестрикції Nco I. Продукт розщеплення поліморфної ділянки гену TLR4 (Asp299Gly) виявляли за допомогою електрофорезу в 3 % агарозному гелі. Гель забарвлювали етидіумом бромідом з подальшою візуалізацією результатів в УФ-світлі. Запропонована методика дає можливість визначити 3 типи генотипу гена Toll-подібного рецептора 4: GG/GG - гомозигота мутантного типу, AA/AG - гетерозигота, AA/AA - «дикий» тип розподілу алелів. Виявлення алеля G TLR4 за результатами проведених полімеразних ланцюгових реакцій засвідчує та асоціюється із тяжким перебігом atopічної бронхіальної астми.

Приклад конкретного виконання

Хворий Максим Л., 7 років, мешканець м. Полтава, знаходився на стаціонарному обстеженні та лікуванні в педіатричному відділенні №2 алергологічної лікарні Полтавської обласної дитячої клінічної лікарні з 26.04.10 по 14.05.10 р. з діагнозом: бронхіальна астма, atopічна форма, персистуючий перебіг, III ступеню тяжкості, період ремісії, ДН 0 ст. Алергічний риніт, персистуючий. Atopічний дерматит, дитяча форма, середньотяжкий перебіг, період ремісії. Дитина поступила зі скаргами на щоденні напади ядухи, які виникають після контакту з побутовим пилом та протягом дня після фізичних навантажень, нічні напади до 2 раз на тиждень, обмеження фізичної активності. З анамнезу відомо, що з 1 місяця життя з'явилися прояви ексудативно-катарального діатезу, який максимально був вираженим до 1 року. З 6 місячного віку на фоні гострої респіраторної вірусної інфекції тричі за рік хворів на обструктивний бронхіт та двічі - на стенозуючий ларинготрахеїт. На 2 році життя почали з'являтися обструкції до 7 раз на рік без загальних проявів інфекційного процесу. Неодноразово лікувався в пульмонологічному відділенні з діагнозом: обструктивний бронхіт. Отримував антибактеріальну та симптоматичну терапію. У віці 2,6 років вперше спеціалізовано обстежений в педіатричному відділенні №2, встановлено діагноз: бронхіальна астма, atopічна форма, персистуючий перебіг, III ступеню тяжкості, період медикаментозно-обумовленої ремісії, ДН 0 ст. Atopічний дерматит, дитяча форма, середньотяжкий перебіг, період

ремісії. З 4-річного віку з'явилося утруднене носове дихання. Діагностовано алергічний риніт, персистуючий, сенсibilізація до побутових алергенів. Тривало отримував базисну терапію фліксотидом. З 4 років почали турбувати щоденні напади ядухи, які не завжди знімалися вентоліном. Тому, дитині в якості базисної терапії призначено серетид в дозі 25/50 мкг (сальметерол/флутиказону пропіонат). З сімейного анамнезу відомо, що у матері прояви медикаментозної алергії, у дідуся по материнській лінії - поліноз, бронхіальна астма (діагностовано після 30 років).

На даний час у хворого виявлено супутню патологію - алергічний риносинусит, atopічний дерматит. В загальному аналізі крові відмічена стійка еозинофілія. При обстеженні виявлена сенсibilізація до побутових алергенів (дом. пил серія № 019-7/2 +++, дом. пил серія № 189 ++, перо подушки серія № 23 ++), епідермальних алергенів (шерсть кішки +++, шерсть кроля +__), мікста пилових алергенів (дерева -; злаки -; бур'яни -); грибкових алергенів (Penicillium sp +, Monilia sitoph +). При імунологічному обстеженні - підвищений рівень загального IgE до 489,3 МО/мл. Функція зовнішнього дихання за даними спірометрії на період ремісії збережена (ОФВ 1 % -86 %).

Отримані клініко-генеологічні дані були занесені в шкалу тяжкості atopії: спадковість по материнській лінії - 2 бала, алергічні захворювання у матері - 1, алергічні захворювання у діда - 0,5, ускладнений перебіг вагітності - 1, пасивне паління в сім'ї - 1; супутня алергопатологія: алергічний діатез в анамнезі - 0,5, стенозуючий ларинготрахеїт - 0,5, atopічний дерматит - 1, алергічний риніт - 2 бала відповідно; спектр сенсibilізації (за результатом специфічного IgE): побутові алергени - 2, епідермальні - 1,5, грибкові - 0,5 відповідно; лабораторні критерії: підвищений загальний IgE - 1, стійка еозинофілія крові - 0,5 балів. Сума балів по шкалі тяжкості atopії відповідно становить 15 балів. Дитині призначено дослідження геномної ДНК для виявлення поліморфної ділянки Asp299Gly гена Toll-подібного рецептора 4.

У результаті рестрикції були отримані фрагменти розміром 263 бп. Тобто у хворого діагностовано одонуклеотидний поліморфізм Toll-подібного рецептора 4 Asp299Gly (AA/AG - гетерозигота), наявність якого визначає тяжкість перебігу астми.

Запропонованим способом в умовах педіатричного відділення №2 Полтавської обласної дитячої клінічної лікарні було обстежено 64 дитини хворих на atopічну бронхіальну астму різного ступеню тяжкості в періоді ремісії. Доцільність запропонованого методу обумовлена високою достовірністю, малоінвазивністю, безпечністю у застосуванні.

Запропонований корисна модель дозволяє не тільки проводити дослідження в сім'ях хворих на бронхіальну астму, але й може бути використаним в якості скринінгового методу стосовно осіб із функціональними маркерами схильності до БА, та осіб, які мають інші прояви алергії, оскільки сімейну обтяженість по захворюванню у старшого покоління не завжди вдається виявити.

Впровадження генетичного обстеження - пріоритетний напрямок практичної медицини, оскільки він спрямований на оптимізацію прогнозування тяжкої бронхіальної астми, можливості вчасного превентивного лікування і використання комплекс-

ної профілактики захворювання у дітей, що, в свою чергу, підвищить медичну допомогу дітям та позитивно позначиться на показниках якості життя дітей.