



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **76786** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
A61B 10/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2012 09201	(72) Винахідник(и):	Пасієшвілі Тамара Мерабівна (UA), Оспанова Тетяна Сумгашевна (UA), Кишеня Марія Сергіївна (UA)
(22) Дата подання заявки:	26.07.2012	(73) Власник(и):	ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, пр. Леніна, 4, м. Харків, 61022 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	10.01.2013	(74) Представник:	Євтушенко Тамара Григорівна
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.01.2013, Бюл.№ 1		

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ РОЗВИТКУ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ У ХВОРИХ З ОЖИРІННЯМ

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування розвитку захворювання включає прогнозування розвитку бронхіальної астми у хворих з ожирінням шляхом аналізу поліморфізму гена ангіотензинперетворюючого ферменту. При виявленні носійства генотипу D/D прогнозують розвиток бронхіальної астми.

UA 76786 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до внутрішніх хвороб, і може бути використаною для визначення ризику розвитку бронхіальної астми (БА) у хворих з надмірною масою тіла і ожирінням.

Відомо, що виникнення багатьох хронічних неінфекційних захворювань внутрішніх органів є генетично обумовленим. Такий висновок було зроблено на підставі багатоцентрових розробок, метою яких було визначення впливу спадковості на формування патології та її перебіг. Тобто можна припустити, що при збігах різних обставин, до яких відносять окремі гени людини, можна прогнозувати виникнення хронічних захворювань внутрішніх органів, а при поєднанні їх з іншою патологією - прогнозування хвороб.

В останні роки активно проводиться вивчення етіології та патогенезу мультифакторної патології БА. В основі формування мультифакторних (комплексних, полігенних) захворювань лежать складні взаємодії генетичних й середовищних факторів. Ідентифікація генів, детермінуючих полігенні захворювання, є однією з складних та важливих завдань сучасної генетики.

Одним із підходів до визначення спадкової схильності є метод аналізу асоціацій поліморфних маркерів генів-кандидатів з прогнозуванням ризику захворювання та розвитку ускладнень [Роль полиморфизма гена ангиотензин-превращающего фермента в реализации влияния суточного профиля артериального давления на формирование гипертрофии левого желудочка у больных с артериальной гипертензией / Г.В. Дзяк, Н.Г. Горовенко, Т.В. Колесник и др. // Укр. кардіол. журн. - 2007. - № 6. - С. 31-39; Полиморфизм гена ангиотензин-превращающего фермента при сердечнососудистой патологии / В.И. Целуйко, Н.А. Кравченко, А.Б. Львова, А.В.Ляшенко // Цитол. и генетика. - 2002. - № 5. - С. 30-33].

Даний спосіб прогнозування розвитку захворювання є найбільш близьким до того, що заявляється, за технічною суттю і результатом, який може бути досягнутим, тому його вибрано за прототип.

В основу корисної моделі поставлена задача прогнозування розвитку БА, що перебігає на тлі ожиріння, для проведення своєчасної корекції та попередження розвитку ускладнень захворювань.

Поставлена задача вирішують тим, що у відомому способі прогнозування розвитку захворювання шляхом аналізу асоціацій поліморфних маркерів генів-кандидатів, згідно з корисною моделлю, прогнозування розвитку бронхіальної астми у хворих з ожирінням здійснюють шляхом аналізу поліморфізму гена ангіотензинперетворюючого ферменту і при виявленні носійства генотипу D/D прогнозують розвиток бронхіальної астми.

Технічний ефект корисної моделі обумовлений можливістю значно покращити прогнозування перебігу БА у хворих з надмірною вагою і ожирінням та зменшити вірогідність розвитку органних дисфункцій.

Спосіб виконують наступним чином: прогнозування розвитку бронхіальної астми у хворих з ожирінням здійснюють шляхом аналізу поліморфізму гена ангіотензинперетворюючого ферменту і при виявленні носійства генотипу D/D прогнозують розвиток бронхіальної астми.

Ефективність способу доказана експериментально.

Вивчали поліморфізм (I/D) гена ангіотензинперетворюючого ферменту (АПФ), який є основним фактором, який визначає концентрацію даного ферменту в плазмі. В 16 інтроні даного гена, який розташований на 17q23р хромосомі, або присутній (I-insertio), або відсутній (D-deletio) фрагмент ДНК, який складається із 263-287 пар Alu послідовностей (Rigat B. et al., 1990, 1991). Рівень АПФ в сироватці крові у здорових осіб гомозиготних за D алелі був в два рази вище, ніж у гомозиготних за I алелі, й мав середнє значення у гетерозигот. D алелі гена АПФ є фактором ризику виникнення судинних катастроф (інфаркту міокарда, спазму коронарних судин, гіпертрофії лівого шлуночка, крововиливів тощо). У хворих гомозиготних за D алелі відзначають підвищений тонус гладеньких м'язів судин.

ДНК виділили з лейкоцитів суцільної крові за допомогою реагенту "ДНК-експрес-кров". В роботі використовували діагностичну тест-систему "SNP-експрес" ACE Alu Ins/Del I>D (Росія). Аналіз поліморфних ДНК-локусів проводили методом полімеразної ланцюгової реакції синтезу ДІЖ з подальшою електрофоретичною детекцією. Реакцію проводили при наступних умовах: первинна денатурація при 93 °С протягом 1 хв., після якої було 35 циклів, які складалися із денатурації при 93 °С протягом 10 сек., відпау праймерів при 64 °С протягом 10 сек., елонгації при 72 °С протягом 20 сек. ПЛР проводили на ампліфікаторі Gene Amp® PCR System 2400 (Applied Biosystems). Аналіз ампліфікованих фрагментів виконували шляхом електрофорезу в 3 %-вому агарозному гелі, забарвленому в бромистому етидії. Візуалізацію результатів проводили в ультрафіолетовому транслюмінаторі "TFX-20.M" ("Vilber Lourmat", Франція). Для визначення зв'язку між поліморфізмами ACE та наявністю діагнозу БА використовували методи:

сполучення, кореляції, частотного аналізу та інші методи оцінки параметричних й непараметричних показників статистики в SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). Оцінку ризику, частот генотипів, алелей й довірчих інтервалів проводили з використанням Microsoft Excel. Різницю в частотах алелей й генотипів між групами оцінювали за допомогою критерію χ^2 та розрахунку відношення ризику (OR) з довірчими інтервалами (CI).

Відносний ризик захворювання за конкретної алелі або генотипу розраховували як співвідношення шансів (odds ratio - OR) за формулою: $OR = (a \times d) / (b \times c)$, де a - частота алелі (генотипу) за вибіркою хворих, b - частота алелі (генотипу) при контрольному виборі; c - сума частот решти алелей (генотипів) у вибірках хворих; d - сума частот решти алелей (генотипів) при контрольному виборі. В разі, якщо один з показників дорівнював 0, приймали правку на неперервність - 0,5. При $OR=1$ - асоціації нема, $OR>1$ - позитивна асоціація захворювання з алелем та генотипом й $OR<1$ - негативна асоціація.

Статистичну обробку проводили за допомогою прикладної програми "Statistica 6.0".

В контрольній групі (50 хворих) I/I генотип гена ACE було виявлено у 16,0 % (8) хворих, генотип I/D - 54,0 % (27), генотип D/D - 30,0 % (15) осіб. В групі хворих з БА виявлено наступне розподілення генотипів: I/I - 11,67 % (7), I/D - 35 % (21), D/D - 53,33 % (32). Розподіл частот генотипів та алелів відповідає рівнянню Харді Вайнберга (PXB).

Проведене дослідження показало, що пацієнтів з БА - носіїв генотипу D/D було практично в 2 рази більше, ніж в контрольній групі (відповідно 53,3 % й 30 %, $p<0,05$). OR розвитку БА складав 2,67 для пацієнтів з D/D генотипом (довірливий інтервал (ДІ) 1,21-5,87). Для генотипу I/D OR розвитку БА складав 0,46 (ДІ 0,21-0,99), що вказувало на можливу протективну роль I алелі. Для генотипу I/I OR розвитку БА склав 0,69 (ДІ 0,23-2,1). Аналіз залежності стадії БА та генотипу гена ACE показав, що у хворих з БА 2 стадії генотип D/D зустрічався в 66,7 %, з 3 стадією - 40,62 %, з 4 стадією - 69,24 %.

Отримані дані дозволили припустити негативне прогностичне значення генотипу D/D даного поліморфізму в патогенезі БА.

Ефективність способу ілюструють наступні приклади.

Приклад 1

Хвора П., 51 рік. Бронхіальна астма, 3 ст. середньої тяжкості, персистуючий перебіг, неконтрольована. легенева недостатність (ЛН) 2 ст. Ожиріння 2 ст.

Alu Ins/Del I>D D/D

Скарги: напади ядухи 8-9 разів у добу (уночі 5-6 разів), які купіруються вентоліном, нападоподібний кашель, задишка змішаного характеру, відчуття "свистячого" подиху, загальна слабкість, пітливість.

Анамнез хвороби: з 2000 р. страждає бронхітом з астматичним компонентом. В 2006 р. установленний д-з: БА, лікувалася в обласній клінічній лікарні. З 2006 р. є інвалідом 2 гр., з 2009 р. 3 гр. З 2005 р. приймає інгаляційний глюкокортикостероїд (ІГКС) беклазон 1000 мкг/добу. Відзначає загострення 6-7 разів на рік, при загостренні глюкокортикостероїд (ГКС) в/в кап, еуфілін в/в струминно. Теперішнє погіршення протягом 2-х тижнів, коли після психоемоційного стресу почастішали напади ядухи, кашлю, підсилилася задишка, у зв'язку із чим була прийнята на стаціонарне, обстеження й лікування.

Об'єктивно: Підвищеного харчування. Ціаноз губ. Набряки стоп і гомілок. Над легенями везикулярне дихання, сухі свистячі хрипи у великій кількості. ЧДР 20/хв. Серце - тони ослаблені, діяльність ритмічна. АТ 130/80 мм рт. ст. Живіт м'який, безболісний.

Функція зовнішнього дихання: ЖЄЛ (життєва ємність легенів) - 64,7 %, ОФВ (обсяг форсованого видиху) - 52,5 %, індекс Тіффно - 69,1 %

Висновок: значні вентиляційні порушення за змішаним типом. Проба із бронходилататором позитивна.

Генетичне дослідження: при дослідженні гена АПФ виявлений D/D варіант поліморфізму гена.

Приклад 2

Хвора І., 52 роки. Бронхіальна астма, 3 ст., тяжка форма, гормонозалежна, персистуючий перебіг, неконтрольована. ЛН 2 ст.

Alu Ins/Del I>D D/D

Скарги: напади кашлю, ядухи 6-7 разів у добу (уночі 4-5 разів), тривалістю до 30-40 хв, відчуття "свистячого" дихання, задишка змішаного характеру при незначному фізичному навантаженні.

Анамнез хвороби: З 1980 р. страждає бронхіальною астмою. З 1998 р. постійно приймає ІГКС, у цей час серетид. Неодноразово перебувала на стаціонарному лікуванні в центральній районній лікарні за місцем проживання, в алергологічному відділенні обласної клінічної лікарні.

Загострення 5-6 разів на рік. Є інвалідом 2 групи. Стан нестабільний з листопада 2010 р., коли стали частіше виникати напади ядухи, підсилилася задишка, лікувалася за місцем проживання в селищній лікарні (ГКС в/в кап., ІГКС) з короточасним ефектом. Була прийнята для корекції терапії.

5 Об'єктивно: Стан тяжкий, положення змушене. Ціаноз губ, гіперемія обличчя. Пастозність гомілок і стоп. Перкуторно коробковий звук над легеньми. Над легеньми на тлі ослабленого везикулярного дихання сухі свистячі хрипи у великій кількості. ЧДР 20/хв. Серце - тони звучні, діяльність ритмічна. АТ 140/90 мм рт. ст. Живіт м'який, безболісний.

Функція зовнішнього дихання: ЖЄЛ - 65,5 %, ОФВ - 49,8 %, індекс Тіффно - 64,87 %.

10 Висновок: значні вентиляційні порушення за змішаним типом. Проба із бронходилататором позитивна.

Генетичне дослідження: при дослідженні гена АПФ виявлений D/D варіант поліморфізму гена.

15 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозування розвитку захворювання шляхом аналізу асоціацій поліморфних маркерів генів-кандидатів, який **відрізняється** тим, що прогнозування розвитку бронхіальної астми у хворих з ожирінням здійснюють шляхом аналізу поліморфізму гена ангіотензинперетворюючого ферменту і при виявленні носійства генотипу D/D прогнозують розвиток бронхіальної астми.

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601