



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **90910** (13) **U**
(51) МПК (2014.01)
A61B 10/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 00902	(72) Винахідник(и): Зорій Ірина Анатоліївна (UA), Пашковська Наталія Вікторівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 31.01.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.06.2014	(73) Власник(и): БУКОВИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ МОЗ УКРАЇНИ, пл. Театральна, 2, м. Чернівці, 58002 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.06.2014, Бюл.№ 11	

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ РИЗИКУ ДІАБЕТИЧНОЇ ПОЛІНЕЙРОПАТІЇ У ХВОРИХ НА ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ 2-ГО ТИПУ

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування ризику діабетичної полінейропатії у хворих на цукровий діабет 2-го типу шляхом визначення поліморфізму гена ендотеліальної NO-синтази. Встановлюють частоту розподілу поліморфізму G894T гена ендотеліальної NO-синтази.

UA 90910 U

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме до ендокринології, неврології, може бути використана для прогнозування ризику виникнення діабетичної полінейропатії у хворих на цукровий діабет 2-го типу за визначенням поліморфізму G894T гена ендотеліальної NO-синтази (eNOS).

В останні роки відмічаються тенденції до росту захворюваності на цукровий діабет (ЦД), причому щорічний приріст випадків зазначеної патології становить 5-10 % із подвоєнням цієї цифри кожні 5-10 років (Скрипник Н.В., 2013). ЦД є чинником ризику розвитку ангіопатії (мікро- та макроангіопатії), що є ключовою причиною підвищеної інвалідизації та летальності при цьому захворюванні.

Одним із найбільш поширених і тяжких у лікуванні ускладнень ЦД є діабетична полінейропатія (ДПН). Вірогідність виявлення ДПН за допомогою різних діагностичних тестів складає в межах 28,6 %, при традиційному неврологічному обстеженні - 75,5 % і 100 % відповідно при дослідженні вібраційної чутливості та при проведенні електронейроміографії (ЕНМГ). ДПН є ускладненням ЦД, що значно знижує якість життя хворого, сприяє розвитку нейропатичної форми синдрому діабетичної стопи, що є причиною 55-75 % всіх ампутацій при ЦД (Tesfaye S., 2010).

На сьогодні з патогенетичної точки зору ДПН слід розглядати скоріше як наслідки дій комплексу багатофакторних чинників, однак вагому роль в розвитку ДПН відводиться хронічній ішемізації та пошкодженню нервового волокна внаслідок мікроангіопатій. Результати біопсії великогомілкового нерва й гістологічного дослідження вказують на зниження периваскулярної іннервації при ДПН. Денервація епіневральних судинних шунтів веде до зниження перфузії та до ішемії на рівні ендоневральних капілярів. Всі ці чинники спричиняють пошкодження ендотелію судин, дисфункцію ендотелію, як ендокринного органа. Внаслідок дисфункції ендотелію утворення оксиду азоту (NO) знижується, що полегшує функціонування механізмів, які призводять до прискорення утворення всіх тих структурних змін в судинній стінці, що характерні для ангіопатій (Angeline T. et al., 2011).

ДПН на даний час є об'єктом інтенсивних генетичних досліджень. Водночас дані літератури, щодо генетики ускладнень ЦД в українській популяції, а саме поліморфізму гена ендотеліальної NO-синтази (eNOS), що може виступати як потенціальний модифікатор діабетичних ангіопатій, малочисельні та суперечливі (Ritt M. et al., 2008.).

Відомо, що поліморфізм генів, що детермінують функціональний стан ендотелію, є причиною схильності організму до розвитку різних патологічних станів, у першу чергу до ангіопатій. Ген eNOS, відповідає за синтез NO ендотелієм і є ключовим ферментом у регуляції тону кровеносних судин, в роботі гладенько-м'язової мускулатури судинної стінки і процесів тромбоутворення (Mathew J. et al., 2008).

Ген eNOS розташований в локусі 7q36, має розмір 21 п.н., 26 екзонів і кодує білок з мол. масою 135 кД, що складається 1203 амінокислоти. Точкова заміна гуаніну на тимін у позиції 894 у 7-му екзоні (GAG на GAT) гена eNOS призводить до зміни амінокислотної послідовності білка: глутамін у позиції 298 змінюється на аргінін (Glu298Asp), цей поліморфізм імовірно асоційований з пониженням базального рівня продукції NO (Jíra M. et al., 2011). Відомо, що мутації гена eNOS, що призводять до зниження рівня NO, є сприяючим чинником до розвитку ангіопатії. Тому поліморфізм в гені eNOS може стати прогностично важливим у формуванні групи ризику швидкого розвитку синдрому діабетичної стопи, виразково-нагнійних процесів та ампутації нижніх кінцівок у хворих на ЦД 2-го типу.

Аналогами корисної моделі є спосіб визначення генетичної схильності до гіпертонії у хворих на цукровий діабет 2-го типу шляхом детекції наявності або відсутності нуклеотидних поліморфізмів в гені NO-синтази (David W Moskowitz. Nitric oxide synthase gene diagnostic polymorphisms // Патент WO2001053537 A2 (Заявл. 24.01.2001, № PCT/US2001/002260)), а також спосіб прогнозування ризику розвитку ускладнень цукрового діабету 2-го типу, що заснований на ідентифікації одного або декількох нуклеотидних поліморфізмів у хворих на ЦД 2-го типу (Pavel Hamet, Johanne Tremblay, Ondrej Seda, Stephen Macmahon, John Chalmers. Methods and compositions for characterizing patients for clinical outcome trials // Патент US20100136540A1 (Заявл. 15.07.2009, № US12/457,556)).

Найближчим аналогом до корисної моделі є спосіб прогнозування генетичної схильності ризику розвитку діабетичної полінейропатії (Тарасенко Н.В. Полиморфизмы гена эндотелиальной синтазы оксида азота при сахарном диабете 1 типа и сосудистых осложнениях / Т.В. Косьянкова, Е.И. Кондратьева, В.П. Пузырев / Генетика человека и патология: Сборник научных трудов / Под ред. В.П. Пузырева. - Вып. 7. - Томск: Печатная мануфактура, 2004. - С. 238-246.). За способом-аналогом визначали розподіл алелів і генотипів поліморфних маркерів VNTR4a/b гена ендотеліальної NO-синтази.

Недоліками аналогу є те, що цей спосіб не визначає поліморфізм G894T гена ендотеліальної NO-синтази, що є предиктором розвитку ішемії нервового волокна. Крім того, зазначений спосіб не дозволяє оцінити ризик розвитку ДПН у хворих на ЦД 2-го типу. Нами пропонується рішення, що усуває вказані недоліки.

В основу корисної моделі поставлена задача вдосконалити спосіб прогнозування ризику розвитку ДПН у хворих на ЦД 2-го типу за G894T поліморфізмом гена ендотеліальної NO-синтази.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі прогнозування ризику ДПН у хворих на ЦД 2-го типу виділяли ДНК з клітин крові, проводили детекцію поліморфізму G894T в гені eNOS методом полімеразної ланцюгової реакції; алельний поліморфізм визначали ампліфікацією з наступною рестрикцією. Спільними ознаками найближчого аналога та корисної моделі є прогнозування ризику ДПН за поліморфізмом гена ендотеліальної NO-синтази.

Корисну модель виконують наступним чином.

У пацієнтів встановлювали частоту розподілу поліморфізму G894T гена ендотеліальної NO-синтази у хворих на цукровий діабет 2-го типу з діабетичною полінейропатією.

Корисна модель розроблена і пройшла клінічні випробування при обстеженні 110 хворих на ЦД, що перебували на лікуванні в стаціонарному відділенні Чернівецького обласного ендокринологічного центру та 80 практично здорових осіб, що склали контрольну групу. Нами використовувались набір реактивів «ДНК-сорб-В» ("АмпліСенс", Росія), рестриктаза Eco24I. Розподіл хворих здійснювався за ступенем тяжкості ДПН: у 34 хворих діагностовано легкий ступінь ДП (31,0 %), у 58 хворих - середній ступінь (52,7 %) та у 18 (16,3 %) хворих на ЦД 2-го типу діагностовано тяжкий ступінь захворювання.

Аналіз генотипів показав, що при розподілі алельних варіантів гена eNOS (G894T поліморфізм) і в контрольній, і в основній групі пацієнтів переважав гетерозиготний генотип G/T. Так, в контролі його частота складала 48,8 %, в основній групі хворих - 43,6 %. Гомозиготний генотип G/G в контрольній групі спостерігався у 39,8 % та гомозиготний генотип по рідкісному алелі T/T тільки у 11,2 % осіб. Серед хворих на ЦД 2 типу, ускладнений ДП генотипи розподілялись наступним чином: генотип G/G встановлений у 40,1 % (44 особи), гетерозиготний генотип G/T - у 43,6 % (48 особи) та гомозиготний генотип T/T за рідкісним алелем - у 18 осіб (16,3 %). Таким чином, генетично зумовлений ризик появи виражених ознак діабетичної полінейропатії у хворих на цукровий діабет 2-го типу насамперед асоційований з наявністю гомозиготного генотипу T/T за рідкісним алелем гена ендотеліальної NO-синтази.

Приклад практичного використання способу № 1.

Хворий В., 53 роки, історія хвороби № 614. Діагноз: Цукровий діабет, 2 тип, середньої важкості, субкомпенсований. Діабетична дистальна сенсорна симетрична полінейропатія ніг, початкова стадія, мікроангіопатія нижніх кінцівок. За шкалою Невропатичного Симптоматичного Підрахунку (NSS) кількість балів становила - 8 балів, Модифікованого Невропатичного Дисфункціонального Підрахунку (NDS) - 3 бали, ЕНМГ-параметри: ШПЗм по малогомілковому нерву (м/г) - 39,2 м/с, по великогомілковому нерву (в/г) - 42,7 м/с, термінальна латентність: по м/г - 6,6 мс, по в/г - 6,9 мс. У хворого встановлений гетерозиготний генотип G/T гена eNOS.

Приклад використання способу № 2

Хворий К., 59 років, історія хвороби № 565. Діагноз: Цукровий діабет, 2 тип, середньої важкості, субкомпенсований. Діабетична дистальна сенсорно-моторна симетрична полінейропатія ніг, явна стадія з больовим синдромом, мікроангіопатія нижніх кінцівок. За шкалою NSS кількість балів становила - 6 балів, NDS - 5 бали, ЕНМГ-параметри: М-дповідь по м/г н. - 5,23 мВ, по в/г нерву - 4,50 мВ; ШПЗм по м/г н. - 41,80 м/с, по в/г н. - 38,80 м/с, термінальна латентність: по м/г н. - 7,6 мс, по в/г - 6,9 мс. У хворого встановлений гомозиготний генотип G/G гена eNOS.

Приклад використання способу № 3.

Хворий Г., 54 років, історія хвороби № 1062. Діагноз: Цукровий діабет, 2 тип, важка форма, декомпенсований. Діабетична дистальна сенсорно-моторна симетрична полінейропатія ніг, виражена стадія з больовим синдромом, мікроангіопатія нижніх кінцівок. За шкалою NSS кількість балів становила - 8 балів, NDS - 7 бали, ЕНМГ-параметри: М-дповідь по м/г н. - 4,56 мВ, по в/г нерву - 4,10 мВ; ШПЗм по м/г н. - 30,80 м/с, по в/г н. - 30,58 м/с, термінальна латентність: по м/г н. - 6,9 мс, по в/г - 7,1 мс. У хворого встановлений гомозиготний генотип T/T за рідкісним алелем гена eNOS.

Технічний результат: наведений спосіб дозволяє спрогнозувати ризик розвитку діабетичної полінейропатії у хворих на цукровий діабет 2-го типу.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозування ризику діабетичної полінейропатії у хворих на цукровий діабет 2-го типу шляхом визначення поліморфізму гена ендотеліальної NO-синтази, який **відрізняється** тим, що

5 встановлюють частоту розподілу поліморфізму G894T гена ендотеліальної NO-синтази.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

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