



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **73570**

(13) **U**

(51) МПК

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2012 04088	(72) Винахідник(и):	Литвинець Людмила Ярославівна (UA)
(22) Дата подання заявки:	03.04.2012	(73) Власник(и):	Литвинець Людмила Ярославівна,
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	25.09.2012		вул. Франка, 25-А, кв. 48, м. Івано-Франківськ, 76018 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.09.2012, Бюл.№ 18		

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ГЕНЕТИЧНИХ МАРКЕРІВ У ДІТЕЙ З БРОХІАЛЬНОЮ АСТМОЮ

(57) Реферат:

Спосіб діагностики генетичних маркерів у дітей з різним ступенем контрольованості бронхіальної астми включає дослідження, виділення та очистку ДНК методом полімеразної ланцюгової реакції.

UA 73570 U

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме до дитячої алергології і може бути використана для визначення генетичних маркерів у дітей з бронхіальною астмою як в процесі діагностики, так і для оцінки ефективності лікування та при диспансерному спостереженні, при визначенні прогнозу, розробки реабілітаційних програм.

Ідентифікація специфічних генів і екзогенних факторів, які, взаємодіючи між собою, формують стійкість людини до середовища проживання, представляє значний інтерес для клінічної медицини. Однак, вочевидь, спектр реакцій різних індивідумів на однотипні зовнішньосередовищні впливи достатньо варіабельний і коливається від збереження упродовж певного періоду здоров'я у одних, до розвитку тяжких захворювань у інших. Якщо однакові впливи призводять до різних реакцій організму, то обов'язково постає питання про причинні фактори такої вибіркості.

Відомо, що діти є найбільш сприйнятливою групою населення до шкідливих впливів зовнішніх факторів внаслідок недосконалого розвитку всіх функціональних систем організму. Тому в умовах несприятливої екологічної ситуації особливої актуальності набувають проблеми вивчення вкладу генетичних і зовнішньосередовищних чинників у патогенез хронічних захворювань систем, які безпосередньо контактують із факторами зовнішнього середовища (дихальна, шлунково-кишковий тракт і т.д.).

Бронхіальна астма (БА) займає провідне місце у структурі бронхолегеневих захворювань, що викликаються впливом пневмотропних забруднювачів. Доведено, що у 2-15 % пацієнтів основною причиною бронхіальної обструкції є безпосередній вплив органічних і неорганічних хімічних сполук. В той же час, дослідження останніх років показали, що клінічні прояви і перебіг БА у дітей, що проживають в однакових умовах, визначаються не стільки характером, складом і тривалістю впливу несприятливих факторів зовнішнього середовища, скільки індивідуальними особливостями організму. Тому актуальним є вивчення тих систем організму, які визначають тип та ступінь його реакцій у відповідь на середовищні впливи.

Важливу роль у захисті легень від токсичних продуктів відіграють ферменти системи біотрансформації ксенобіотиків (ДТК). Дисбаланс між здатністю організму знешкоджувати ксенобіотики і їх надходженням в організм може призвести до небажаних наслідків, таких як порушення гомеостазу та накопичення токсичних речовин. Система захисту від ксенобіотиків представлена триетапним процесом, що включає фази активації, нейтралізації і виведення ксенобіотиків із організму та забезпечується системою ферментів ДТК. В кожній групі ферментів, що приймають участь у детоксикації, можуть виявлятися мутантні ізоформи, функція яких порушена у порівнянні із нормальними алелями. На сьогодні відомо, що функціонально неповноцінні алелі значно частіше зустрічаються у осіб із захворюваннями, в етіології яких важливу роль відіграють несприятливі екзогенні фактори.

Поза тим, процес ДТК регулюється відповідними генами, що контролюють кожну із фаз детоксикації. До таких генів належать: гени цитохромів Р 450, цитоплазматичної та мікросомальної ЕРHX1, родини GST-GSTNT1, GSTM1, GSTP1, гени ацетилювання ксенобіотиків - NAT1, NAT2, VDR і ін. На відміну від моногенних хвороб, для виникнення яких достатньо наявності мутацій в структурному гені, БА належить до групи мультифакторних захворювань, в розвитку яких задіяні як генетичні, так і екзогенні фактори. Одним із генів, що може бути причетним до розвитку БА, є ген ЕРHX1, локалізований на хромосомі 1 в локусі Iq 42.1, а зростання активності ферментів, що кодуються mEPHX1, індукуює накопичення активних інтермедіатів, сприяє виникненню оксидативного стресу, і, як наслідок, розвитку захворювання.

Відомий спосіб визначення молекулярно-генетичних особливостей формування і перебігу професійного бронхіту у працівників промислових підприємств республіки Башкортостан, які піддаються впливу промислових аерозолів складної структури для розробки системи профілактичних заходів [Мингазова С.Р. Клинико-генетические особенности профессионального бронхита у работников промышленных предприятий / Мингазова С.Р. // Автореф. канд. мед. наук. - М.: - 2011].

Проте, цей спосіб не може бути використаний у дітей з бронхіальною астмою, оскільки не відображає впливу саме бронхіальної астми на якість життя хворої дитини, не застосовувався в принципі для діагностики та оцінки тяжкості перебігу даного захворювання у дітей, а запропонований як генетичні особливості професійного бронхіту у дорослих.

Найбільш близьким до корисної моделі, що заявляється, є спосіб оцінки ролі поліморфізму генів ферментів метаболізму ксенобіотиків у розвитку бронхіальної астми і туберкульозу, який полягає в тому, що дозволяє вивчити поширеність частот поліморфних варіантів генів ферментів метаболізму ксенобіотиків у вибірці здорових індивідів, а також оцінити зв'язок поліморфізму досліджуваних генів з atopічною бронхіальною астмою та туберкульозом легень у дорослій популяції [Брагина Е.Ю. Сравнительный анализ наследственной компоненты

подверженности к бронхиальной астме и туберкулезу по генам ферментов метаболизма ксенобиотиков - / Е.Ю. Брагина // Автореф. канд. биол. наук. - Томск, 2005].

Проте, дана методика належить виключно до галузі дорослої пульмонології та алергології і була запропонована для вивчення лише на конкретній популяційній вибірці, що не може бути

однозначно використано для порівняння результатів генетичних досліджень між різними популяціями людей, що проживають на різних, в плані екології, територіях.

Крім того, ці способи діагностики бронхіальної астми у дітей не враховують важливості впливу генетичної компоненти на розвиток даної недуги, як мультифакторіального захворювання та, у зв'язку з цим, не оцінюють можливих шкідливих впливів факторів навколишнього середовища на тяжкість перебігу астми у дітей.

В основу запропонованої корисної моделі поставлено задачу винайти маркери шляхом генетичних досліджень, які б дозволили забезпечити можливість молекулярно-генетичної діагностики бронхіальної астми у дітей, враховуючи детоксикацію ксенобіотиків в популяції здорових та дітей із БА.

Поставлена задача вирішується тим, що за способом діагностики генетичних маркерів у дітей з різним ступенем контролюваності бронхіальної астми, що включає визначення генів ферментів детоксикації ксенобіотиків I фази генетичних досліджень ДНК, виділеної із лейкоцитів периферійної крові пацієнтів, виділення та очистку ДНК за допомогою комерційних наборів DIAtom™ DNA Prep200, GenePak DNA PCR test, подальше дослідження ампліфікації послідовностей ДНК in vitro методом полімеразної ланцюгової реакції в автоматичному режимі на термоциклері "Терцик" з використанням олігонуклеотидних праймерів набору реагентів для ампліфікації GenePak® PCR Core, визначення специфічності ПЛР-продуктів послідовністю специфічних праймерів, температурою відпалу та складом реакційної суміші генотипування поліморфних локусів досліджуваних генів на основі програм проведення полімеразної ланцюгової реакції та кількості циклів, згідно з запропонованою корисною моделлю, поліморфні варіанти гена mEPHX1 визначають за допомогою мультилокусної ПЛР, далі проводять комплексний аналіз поліморфізму гена mEPHX1, визначають у локусі T337C частоту гомозиготних мутантних делецій CC, нормального гомозиготного алелю TT у дітей із різними фенотипами бронхіальної астми, а у локусі A415G гомозиготний варіант GG активності ферментів, що кодуються mEPHX1, за якими оцінюють індукування накопичення активних інтермедіатів, виникнення оксидативного стресу і розвиток захворювання, при цьому маркерами взаємозв'язку спадкових і середовищних факторів у детермінації бронхіальної астми та розвитку ступеня тяжкості захворювання використовують гомозиготні варіанти AA та CC і гетерозиготний варіант AG генетичних досліджень.

Таким чином, опираючись на відомі дані, що у носіїв мутантного генотипу CC швидкість ДТК знижується до 50,0 %, оскільки поліморфізм гена mEPHX 1 чітко корелює з рівнем ферментативної активності білка [Zusterzeel et al., 2001] і, проаналізувавши фенотипові прояви БА та спираючись на те, що фермент може знаходитись у декількох функціонально різних станах - "повільному", "швидкому", "нормальному", обумовлених мутаціями в 3-му і 4-му екзонах, відповідно, виділили 3 фенотипи: "швидкий" - має 1 або 2 мутації в екзоні 4-му і не має мутацій в екзоні 3 (TT-GG або AG); "повільний" - 2 мутації в 3 екзоні і відсутні в 4-му (CC-AA); "нормальний" або "проміжний" - не має мутації в гені mEPHX1 або є гетерозиготним по мутаціях в 3 і 4 екзонах (TT-AA або TC-AG) і на основі отриманих нами даних доведено, що наявність "повільного" генотипу у дітей з неконтрольованою бронхіальною астмою (НКБА) у 1,5 разу перевищує такий у дітей з частково контрольованою бронхіальною астмою (ЧКБА). Висока активність ферменту спостерігається у дітей з НКБА достовірно частіше. При цьому у дітей із БА незалежно від фенотипу найбільш поширеними є комбінації алелей AA-TT та AG-TT, які відповідають "швидкому" метаболізму ферментів детоксикації ксенобіотиків (ДТК) в організмі, тобто спостерігається тенденція до накопичення мутантного генотипу, що при недостатній активності ферментів II фази ДТК призводить до накопичення активних інтермедіатів. Аналіз поширеності частот генотипів поліморфізму TC-AG, що відповідає "проміжному" рівню ферментативної активності, підтверджує статистично достовірну різницю частот у пацієнтів із ЧКБА. Найчастіше у пацієнтів із БА має місце "швидкий" функціональний стан ферментів, що кодуються геном mEPHX1, спостерігається і "повільний" функціональний стан гена mEPHX1, що відповідає варіантам гомо- та гетерозигот по мутантних алелях: CC-AA та TC-AA. Крім того, аналіз поширеності частот даних генотипів між пацієнтами із НКБА та ЧКБА, засвідчує, що зареєстровані показники є більшими у дітей із тяжчим перебігом захворювання. Поширеність алелей поліморфних варіантів гена mEPHX1, що відповідають "проміжному" рівню ферментативної активності, є меншою у обох групах пацієнтів.

Тенденція до збільшення частоти мутантного генотипу у пацієнтів із БА та її пряма залежність від ступеня тяжкості захворювання вказує на те, що розвиток і прогресування БА у дітей пов'язаний із накопиченням проміжних електрофільних метаболітів, що сприяє виникненню оксидативного стресу. Отримані результати підтверджують, що комбінація різних

поліморфних варіантів гена *mEPHX1* та наявність "швидких" і "повільних" його варіантів є доволі вагомим прогностичним фактором щодо розвитку та тяжкості перебігу БА, а на реалізацію БА, як екодетермінованої патології, впливають індивідуальні варіанти метаболічної активності генів детоксикації ксенобіотиків.

Отже, генетичний поліморфізм генів ферментів біотрансформації ксенобіотиків приводить до відмінностей в їх активності, а притаманні ферментам індукцибельність і генетичні відмінності лежать в основі широкої міжіндивідуальної варіабельності в метаболізмі чужорідних сполук, створюючи можливість дисбалансу процесів детоксикації і токсифікації, тобто, запропоновані згідно з корисною моделлю маркери дозволять забезпечити можливість молекулярно-генетичної діагностики бронхіальної астми у дітей, враховуючи детоксикацію ксенобіотиків в популяції здорових та дітей із БА.

Таким чином, сукупність запропонованих і відомих суттєвих ознак і їх причинно-наслідковим зв'язком отримують технічний результат, достатній для вирішення поставленої задачі корисної моделі.

Спосіб діагностики генетичних маркерів у дітей з бронхіальною астмою здійснюють так: із лейкоцитів периферичної крові пацієнта проводять виділення та очистку ДНК, ампліфікацію послідовностей ДНК *in vitro* методом ланцюгової полімеразної реакції в автоматичному режимі на термоциклері "Терцик", використовуючи олігонуклеотидні праймери; специфічність ПЛР-продуктів визначають послідовністю специфічних праймерів, температурою відпалу та складом реакційної суміші; генотипування поліморфних локусів досліджуваних генів проводять з використанням різних програм проведення полімеразної ланцюгової реакції та різної кількості циклів; поліморфні варіанти гена *mEPHX1* визначають за допомогою мультилокусної ПЛР та проводять комплексний аналіз поліморфізму гена *mEPHX1*.

Приклад.

Обстежено запропонованим способом 94 дітей віком від 6 до 18 років, хворих на БА, які лікувалися в алергологічному відділенні ОДКЛ м. Івано-Франківська в 2009-2010 рр. та групу контролю, яку склали діти, відібрані методом випадкової вибірки, що проживають в різних районах Івано-Франківської області (157 осіб). Діагноз БА верифікували згідно із Протоколом діагностики і лікування БА у дітей. Щодо рівня контрольованості БА, діти були розподілені наступним чином: 44 (46,8 %) - із частково контрольованою астмою (ЧКБА), 50 (53,2 %) - із неконтрольованою астмою (НКБА).

Аналіз частоти комбінацій генотипів *mEPHX1* генів детоксикації ксенобіотиків у дітей з різним ступенем контрольованості БА показав, що фенотипічний варіант БА значною мірою визначається станом генотипу. Зокрема, гомозиготна мутантна делеція *CC* (*His113His*) мала місце у 20,5 % обстежених із НКБА та у 12,0 % пацієнтів із ЧКБА ($p < 0,05$). При цьому вказаний показник у пацієнтів із НКБА відрізнявся від такого у здорових ($p_N > 0,05$). Порівняння частот аллелів і генотипів *TC* (*Tyr113His*) у дітей з різним ступенем контролю БА виявило, що у дітей з НКБА гетерозиготії склали 31,8 % проти 46,0 % у дітей з ЧКБА ($p < 0,05$), причому достовірно спостерігалась різниця із аналогічним показником у здорових ($p_N < 0,01$). Щодо порівняння частот нормального гомозиготного алелю *TT* (*Tyr113Tyr*) у дітей з різними фенотипами БА та у здорових достовірної різниці виявлено не було.

Щодо наявності поліморфних варіантів локусу *A415G* гена *mEPHX 1* у дітей з різним ступенем контролю недуги, отримані наступні дані: у дітей із НКБА - гомозиготний варіант *GG* фіксувався вірогідно частіше (13,6 % проти 8,0 % у здорових ($p_N < 0,05$)). Переважання гомозиготного варіанта *GG* вказує на збільшення активності ферментів, що кодуються *mEPHX 1*, до 20,0 %. За таких умов, у дітей з тяжким перебігом БА, незважаючи на високу активність ферментів, тяжкість протікання недуги визначається недостатньою активністю продуктів генів II фази ДТК. В той же час, зростання активності ферментів, що кодуються *mEPHX 1*, індукує накопичення активних інтермедіатів, сприяє виникненню оксидативного стресу, і, як наслідок, розвитку захворювання. Гомозиготний варіант *AA* (*His 139 His*) у дітей із ЧКБА та НКБА був на рівні 48,0 % і 47,6 %, відповідно, та зустрічався значно рідше, ніж у здорових ($p_N < 0,05$). Гетерозиготний варіант *AG* (*His139Arg*) практично з однаковою частотою був зафіксований у дітей з НКБА (42,0 %) та ЧКБА (38,8 %). В той же час, у здорових цей варіант зустрічається частіше, ніж у дітей з БА ($p_N < 0,05$).

Таким чином, запропонованим способом діагностики генетичних маркерів у дітей з бронхіальною астмою визначається, що на реалізацію БА, як екодетермінованої патології,

впливають індивідуальні варіанти метаболічної активності генів детоксикації ксенобіотиків. Наявність генотипу CC та GG у дітей з БА з високою ймовірністю ($p < 0,05$) передбачає її неконтрольований перебіг, у дітей із БА має місце висока ферментативна активність гена mEPHX1, що чітко корелює із ступенем тяжкості захворювання, генетичне тестування дітей із

5 БА дозволяє виявити наявні у геномі тенденції до появи БА та розвитку захворювання певного ступеня тяжкості, намітити шляхи ранньої профілактики і за допомогою корекції послабити несприятливі ефекти функціонально неповноцінних алельних генів схильності.

Пропонований спосіб діагностики генетичних маркерів у дітей з бронхіальною астмою забезпечує можливість молекулярно-генетичної діагностики бронхіальної астми у дітей шляхом

10 виявлення поліморфізму генів ферментів I фази детоксикації ксенобіотиків.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб діагностики генетичних маркерів у дітей з різним ступенем контрольованості бронхіальної астми, що включає визначення генів ферментів детоксикації ксенобіотиків I фази генетичним дослідженням ДНК, виділеної із лейкоцитів периферійної крові пацієнтів, виділення та очистку ДНК за допомогою комерційних наборів DIAtom™ DNA Prep200, GenePak DNA PCR test, подальше дослідження ампліфікації послідовностей ДНК in vitro методом полімеразної ланцюгової реакції в автоматичному режимі на термоциклері "Терцик" з використанням

15 олігонуклеотидних праймерів набору реагентів для ампліфікації GenePak® PCR Core, визначення специфічності ПЛР-продуктів послідовністю специфічних праймерів температурою відпалу та складом реакційної суміші генотипуванням поліморфних локусів досліджуваних генів на основі програм проведення полімеразної ланцюгової реакції та кількості циклів, який

20 **відрізняється** тим, що поліморфні варіанти гена mEPHX1 визначають за допомогою мультилокусної ПЛР, далі проводять комплексний аналіз поліморфізму гена mEPHX1, визначають у локусі T337C частоту гомозиготних мутантних делецій CC, нормального гомозиготного алелю TT у дітей із різними фенотипами бронхіальної астми, а у локусі A415G гомозиготний варіант GG активності ферментів, що кодуються mEPHX1, за якими оцінюють

25 індукування накопичення активних інтермедіатів, виникнення оксидативного стресу і розвиток захворювання, при цьому маркерами взаємозв'язку спадкових і середовищних факторів у детермінації бронхіальної астми та розвитку ступеня тяжкості захворювання використовують гомозиготні варіанти AA та CC і гетерозиготний варіант AG генетичних досліджень.

30

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

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