



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **94298** (13) **U**
(51) МПК (2014.01)
A61B 5/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 05073	(72) Винахідник(и): Смутьська Наталія Омелянівна (UA), Горовенко Наталія Григорівна (UA), Зозуля Іван Савович (UA)
(22) Дата подання заявки: 13.05.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.11.2014	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ ІМЕНІ П.Л. ШУПИКА, вул. Дорогожицька, 9, м. Київ, 04112 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.11.2014, Бюл.№ 21	

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ СХИЛЬНОСТІ ДО ВИНИКНЕННЯ ІШЕМІЧНИХ ІНСУЛЬТІВ (II) У ДІТЕЙ

(57) Реферат:

Спосіб визначення генетичної схильності до виникнення ішемічних інсультів (II) у дітей включає проведення молекулярно-генетичного дослідження генетичної схильності до тромбофілії з вивченням поліморфізму генів MTHFR C677T, FII G20210A, FV G1691 A, та додатково генів MTHFR A1298C, MTRR A66G, ACE I/D у дітей з II.

UA 94298 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до неврології, і може бути використана у практичній медицині для прогнозування та виявлення генетичної схильності до розвитку гострого ішемічного інсульту (II) у дитячому віці та при наявності виявлених змін проведення корекції життя дитини для попередження виникнення повторних випадків.

5 За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я інсульт (I) - це стан, при якому швидко з'являються ознаки фокального або загального порушення мозкових функцій, що зберігаються 24 години або більше, та можуть призводити до смерті хворого.

Донедавна інсульт вважався прерогативою людей старшого віку, а випадки інсультів у дітей - казуїстичними. В той же час за результатами окремих епідеміологічних досліджень наводять 10 різні цифри частоти ішемічних інсультів у дітей: від 2-3 на 100000 осіб серед дитячого населення на рік [1], до 6 на 100000 [2], що пов'язують з покращенням діагностики інсульту в дитячому віці.

За причинами, що призвели до порушення функції мозку інсульти у дітей розділяються на ішемічні та геморагічні. В свою чергу в залежності від віку виникнення ішемічні інсульти (II) 15 розмежовуються на дві групи: ішемічні інсульти перинатального періоду (час розвитку від 20-го тижня гестації до 28 днів після народження) та ішемічні інсульти дитячого віку (починаючи з 29-го дня життя до 18- років).

Відомо, що частіше II трапляються у більш ранньому віці, а саме на 1-му році життя, зі зниженням їх кількості у віці 5-9 років та подальшим збільшенням випадків у пубертатному 20 періоді [3]. Частіше інсульти спостерігаються у хлопчиків, ніж у дівчат, співвідношення 1,5: 1 [4]. Інсульти у дітей призводять до важких змін в неврологічному стані, які мають індивідуальні, сімейні, економічні та соціальні наслідки.

Причини виникнення II у дитячому віці досить різноманітні та відрізняються від дорослих. За даних літератури існує більш 100 факторів ризику, які призводять до розвитку інсультів у дітей. 25 Досить важливою є генетична схильність, а саме наявність у дитини певного генотипу, який призводить до розвитку тромботичного стану (тромбофілії), та характеризується спадковим або набутим порушенням в системі згортання крові, що підвищує ризик розвитку тромбозу, наявність якого становить від 10 до 50 % від усіх можливих причин II у дитячому віці [5].

В міжнародній літературі приділено багато уваги молекулярно-генетичному обстеженню для виявлення генетичної схильності до II у дитячому віці по 3-х основних генах (MTHFR C677T, FII 30 G20210A, FV G1691 A), саме наявність поліморфізму яких і може призвести до розвитку II у дитини [6, 7]. В Україні раніше не визначалася генетична схильність до II у дитячому віці.

Найбільш близьким за технічним рішення до способу, що заявляється та взятий нами за прототип, спосіб діагностики спадкової схильності до тромбофілії включає проведення 35 молекулярно-генетичного дослідження з вивченням поліморфізму генів MTHFR C677T, FII G20210A, FV G1691A [8]. Однак вказаний спосіб виявлення генетичної схильності до розвитку тромбофілії не виявляє усі випадки спадкової схильності.

Удосконалення проведення діагностики генетичної схильності до розвитку II у дитячому віці 40 дозволить на ранніх етапах прогнозувати та попередити розвиток повторних випадків і є задачею винаходу, що пропонується.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі діагностики спадкової схильності до тромбофілії, який включає проведення молекулярно-генетичного дослідження з вивченням поліморфізму генів MTHFR C677T, FII G20210A, FV G1691A у дітей, що перенесли II, 45 згідно з корисною моделлю пропонується проводити дослідження наступних генів: MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTRR A66G, ACE I/D. Вперше запропоновано комплексне дослідження генів спадкової тромбофілії у дітей, що перенесли II.

Поліморфний варіант гену MTHFR C677T разом з іншим варіантом MTHFR гену - A1298C та геном MTRR A66G відіграють велику роль у фолатному циклі, наявність поліморфізму та/або мутації саме в цих генах одночасно у одної дитини можуть посилювати дію один одного та 50 погіршувати перебіг захворювання. Мутація гену ACE I/D призводить до підвищення тонуусу гладкої мускулатури судин та підвищеної схильності до гострої ішемії і впливати на виникнення спазму судин.

Обстеження більш повного набору генів, які впливають на розвиток II допоможе підвищити виявлення генетичної схильності до розвитку II у конкретної дитини, що в подальшому 55 дозволить вчасно попередити повторні випадки, та, при необхідності проводити адекватну терапію. Це все можемо віднести до технічного результату способу, що заявляється.

Відмінною особливістю способу, що заявляється, є виявлення генетичної схильності до розвитку II у ранньому періоді життя людини у віці від 0 до 14 років та більш широкий спектр досліджень в наступному дозволить визначити генотип дитини, та запобігти розвитку повторних 60 випадків II, як у конкретної дитини, так і в родині в цілому.

Для проведення молекулярно-генетичного дослідження у дитини після народження беруть кров з вени у пробірки з ЕДТА кількістю 2,7 мл та обстежують її з використанням методу ПЛР та ПЛР-ПДРФ аналізу з подальшою візуалізацією у 2 % агарозному гелі. Виділення ДНК проводилось з використанням комерційного набору "ДНК-сорб-В". Результати дослідження обробляються за допомогою програми Statistica 6.0. Для визначення вірогідності різниці частот генотипів у порівнюваних групах застосовували критерій χ^2 та відношення шансів Odds Ratio (OR). Статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Отримані результати молекулярно-генетичного аналізу по виявленню поліморфного стану (гетеро- або гомозиготний) досліджуваних генів, дозволяють на ранніх етапах життя, до виникнення симптомів виділити дітей високої групи ризику розвитку ІІ та/або транзиторних ішемічних атак (ТІА).

Було проведено молекулярно-генетичне обстеження 47 дітей, які мали клінічний діагноз ІІ (38 дітей - $80,85 \pm 5,73$ %) та ТІА (9 дітей - $19,15 \pm 5,73$ %). При проведенні молекулярно-генетичного методу у 47 дітей (100 %) були виявлені гетеро- та/або гомозиготні мутації обстежених генів - MTHFR C677T, MTHFR A1298G, Factor II G20210A, Factor V G1691 A, MTRR A66G, ICE I/D - які відповідають за розвиток тромбофілії і тим самим призводять до розвитку гострої ішемії у дитячому віці (основна група). Група контролю склала 44 дитини віком від 0 до 14 років, які не мали гостро розвинутих неврологічних змін від час обстеження.

Спочатку дітям проводилось обстеження раніше запропонованих генів: MTHFR C677T, Factor II G20210A, Factor V G1691 A. Отримані нами результати наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Розподіл частоти генотипів за досліджуваними генами серед досліджуваних груп

Ген/Поліморфізм	Генотипи	Основна група (n=47)		Група контролю (n=44)		Статистичний аналіз			
		n	%	n	%	χ^2	p	OR	95 %CI
MTHFR (C677T)	CC	12	25,53	27	61,36	10,5	0,015	0,22	0,09-0,54
	CT	26	55,32	15	34,09	4,19	0,041	2,39	1,02-5,42
	TT	9	19,15	2	4,55	4,56	0,033	4,97	1,01-24,48
Продовження табл.1									
FV (G1691A)	GG	45	95,74	42	95,45	0	0,946	1,07	0,14-7,95
	GA	2	4,26	2	4,55	0	0,946	0,93	0,13-6,93
	AA	0	0,00	0	0,00	0	0	0	0
FII (G2021A)	GG	45	95,74	43	97,73	0,28	0,596	0,52	0,05-5,98
	GA	2	4,26	1	2,27	0,28	0,596	1,91	0,17-21,85
	AA	0	0,00	0	0,00	0	0	0	0

З наведених даних можна зробити висновок, що, у групі обстежених хворих спостерігалось достовірне підвищення частоти генотипів 677CT, 677TT - за геном MTHFR ($p < 0,05$); при тому, що достовірної статистичної різниці частоти генотипів за генами FII G20210A та FV G1691A в порівнянні групи дітей з ішемічними інсультами та/або транзиторними атаками та контрольної груп виявлено не було ($p > 0,05$).

В таблиці 2 приведені дані з запропонованими нами генами.

Таблиця 2

Ген/Поліморфізм	Генотипи	Основна група (n=47)		Група контролю (n=44)		Статистичний аналіз			
		n	%	n	%	χ^2	p	OR	95 %CI
MTHFR (A1298C)	AA	17	36,17	27	61,36	4,81	0,028	0,36	0,15-0,83
	AC	22	46,81	11	25,00	4,64	0,031	2,64	1,08-6,44
	CC	8	17,02	6	13,64	0,2	0,654	1,27	0,47-3,88
Продовження табл.2									
MTRR (A66G)	AA	12	25,53	26	59,09	9,19	0,002	0,24	0,10-0,58
	AG	17	36,17	10	22,73	1,38	0,241	1,93	0,77-4,88
	GG	18	38,30	8	18,18	4,51	0,034	2,79	1,06-7,34
ACE (I/D)	II	12	25,53	25	56,82	7,97	0,014	0,26	0,11-0,63
	ID	20	42,55	13	29,55	1,15	0,284	1,77	0,74-4,21
	DD	15	31,91	6	13,64	4,23	0,036	2,97	1,03-8,54

З наведених даних можна зробити висновок що, у групі обстежених хворих в порівнянні з групою контролю спостерігалось достовірне підвищення частоти генотипів 1298AC - за геном MTHFR ($p<0,05$); 66AG, 66GG - за геном MTRR ($p<0,05$); ID, DD - за геном ACE ($p<0,05$), що свідчить про асоціацію даних генотипів з ризиком розвитку ішемічних інсультів у дітей. Також нами виявлено значне, статистично значиме, зниження частоти генотипів 677CC, 1298AA за геном MTHFR, 66AA - за геном MTRR; II - за геном ACE у обстежених хворих в порівнянні з контрольною групою, що характеризує протективну дію даних генотипів до розвитку захворювання. Висока достовірність отриманих нами даних свідчить про вплив досліджуваних генів у розвиток ішемічних інсультів.

На наступному етапі було використано метод мультифакторної просторової редукції (MDR 2.0) для побудови статистичної моделі міжгенної взаємодії та обрахування їх потенціалів предикції, тобто передбачення виникнення захворювання. До побудови моделі були залучили всі обрані нами гени, керуючись отриманими нами результатами щодо ролі цих генів в розвитку ішемічних інсультів у дітей. Результати моделювання при ішемічних інсультах у дітей представлені в таблиці 3.

Таблиця 3

Моделі ген-генної взаємодії у розвитку ішемічних інсультів у дітей за допомогою програми MDR 2.0 в режимі всебічного пошуку

Число генів у моделі	Комбінації генів в прогностичній моделі	Відтворюваність моделі	Точність моделі, %
1	ACE_I/D	5/10	65,09
2	MTRR_A66G/ACE_I/D	6/10	71,47
3*	MTHFR_C677T/MTRR_A66G/ACE_I/D	10/10	81,19
4*	MTHFR_C677T/MTHFR_A1298C/MTRR_A66G/ACE_I/D	10/10	82,34

* - визначена найкраща модель ($p\leq 0,001$) серед n - генних моделей

Коефіцієнт перехресної перевірки був найвищим та визначив статистичну вірогідність для найкращих моделей, якими були трьох - та чотирьох-компонентні моделі (таблиця 3), для яких було показано 100 % відтворюваність (10/10) та високу точність передбачуваних ризику розвитку ішемічних інсультів у дітей. Точність моделі була найвищою 82,34 при моделі, яка включала чотири гени - MTHFR_C677T/MTHFR_A1298C/MTRR_A66G/ACE_I/D, а при моделі, до якої було залучено три гени - 81,19, яка була нижчою. Проведення додаткового коригуючого пермутаційного тесту (MDR.pt) підтвердило вірогідність отриманих нами результатів ($p<0,05$).

Суть корисної моделі пояснюється конкретними прикладами застосування способу.

Приклад 1. Хвора Н., 1 рік 2 місяця, історія хвороби № 1499 02.02.2012 р., доставлена зі скаргами на наявність парціальних епілептичних припадків, асиметрію обличчя та зіниць, появу правобічної пірамідної симптоматики. На підставі клінічного та параклінічного обстеження (МРТ, МРА та інше) дитині було встановлено діагноз: гострий ішемічний інсульт.

Клініко-генеалогічним дослідженням було встановлено, що в родині випадків інсультів не спостерігалось.

При проведенні молекулярно-генетичного обстеження поліморфних варіантів генів, що відповідають за розвиток спадкової тромбофілії, у пацієнтки було виявлено несприятливий TT генотип гена MTHFR C677T та GG генотип MTRR A66G, комбінація яких може призводити до розвитку II у дітей.

Таким чином, дівчина не маючи обтяженого сімейного анамнезу, який би виявив випадки інсульту у близьких родичів, має генотип TT по гену MTHFR C677T та GG генотип MTRR A66G, комбінація яких підвищує ризик розвитку II у дітей та може призводити до виникнення II.

Приклад 2. Хвора К., 14 років, історія хвороби № 9765 21.07.2013 р., доставлена зі скаргами на втрату свідомості, повторну блювоту, потім порушення свідомості по типу сопору, з часом зростала неврологічна симптоматика: сонливість, асиметрія обличчя та зіниць, поява правобічної пірамідної симптоматики. На підставі клінічного та пара клінічного обстеження (МРТ, МРА та інше) дитині був виставлений діагноз: гострий ішемічний інсульт.

Генеалогічним дослідженням було встановлено, що по материнській лінії прабабуся та прадідусь померли від інсульту у віці близько 70 років.

При проведенні молекулярно-генетичного обстеження поліморфних варіантів генів, що відповідають за розвиток спадкової тромбофілії, у пацієнтки було виявлено несприятливий TT

генотип гена MTHFR C677T та GG генотип MTRR A66G, а також ID генотип гена ACE I/D, комбінація яких підвищує ризик розвитку II у дітей.

Таким чином, дівчина має обтяжений сімейний анамнез, який виявив повторні випадки смерті від інсульту у близьких родичів, та наявність генотипу TT по гену MTHFR C677T та GG генотип MTRR A66G, а також ID генотип гена ACE I/D, комбінація яких підвищує ризик розвитку II у дітей.

При проведенні комбінації генеалогічного та молекулярно-генетичного обстеження була виявлена висока ступень спадкової схильності у пацієнтки К. до розвитку ішемічних інсультів, в тому числі і повторних, тому для профілактики повторних випадків дівчина потребує ретельного спостереження.

Спосіб визначення генетичної схильності до виникнення ішемічних II у дітей апробовано на базі неврологічного відділення Київської міської дитячої лікарні № 1 на 47 хворих на II та TIA (основна група) віком від 0 до 14 років в порівнянні з контрольною групою - 44 дитини аналогічного вікового розподілу, які під час обстеження не мали будь-якої неврологічної симптоматики.

Як видно з отриманих результатів, за допомогою заявленого способу визначення генетичної схильності щодо розвитку II в дитячому віці точність діагностики та прогнозування вища та більш повна в порівнянні з прототипом, що забезпечує проведення більш коректної та вчасної допомоги та дає можливість запобігти виникненню повторних випадків. Позитивний результат апробації заявленого способу дозволяє рекомендувати його для впровадження у практичну охорону здоров'я.

Джерела інформації:

1. Lynch J.K., Hirtz D.G., deVeber G. Report of the National Institute of Neurological Disorders and Stroke workshop on perinatal and childhood stroke // Pediatrics – 2002-Vol. 109 (1) - p. 116-123.

2. Agrawal N., Johnston S.C., Wu Y.W., Sidney S., Fullerton H.J. Imaging data reveal a higher pediatric stroke incidence than prior US estimates // Stroke – 2009-Vol. 40-p. 3415-21.

3. Laugesaar R., Kolk A., Tomberg T., Metsvaht T., Lintrop M., Varendi H., et al. Acutely and retrospectively diagnosed perinatal stroke: A population based study // Stroke – 2007-Vol. 38-p. 2234-40.

4. Golomb M.R., Fullerton H.J., Nowak-Gottl U., DeVeber G. Male predominance in childhood ischemic stroke: finding from the international pediatric stroke study // Stroke. – 2009-Vol. 40(1) - p. 52-57.

5. Смульська Н.О., Горовенко Н.Г., Зозуля І.С., Россоха З.І., Пічкур Н.О. Ішемічні інсульти у дітей: можливі причини та провокуючі фактори // Современная педиатрия – 2013-1(49) - стр. 66-70.

6. Kenet G, Herak DC, Lutkhoff LK, Albisetti M, Bernard T, Bonduel M, Brandao L, et al. Impact of thrombophilia on arterial ischemic stroke or cerebral sinovenous thrombosis in children: a systematic review & meta analysis of observational studies // Circulation – 2010-Vol. 121-p. 1838-47.

7. Zadro R, Herak D. Inherited prothrombotic risk factors in children with first ischemic stroke // Biochemia Medica – 2012-vol. 22(3) - p. 298-310.

8. Патент RU 2352641 C1. Способ диагностики наследственной предрасположенности к тромбофилии: Е.Н. Воронина, М.Л. Филиппенко (Россия), заявка: 2007141675/13, 09.11.2007; опубликовано 20.04.2009 Бюл. № 11.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення генетичної схильності до виникнення ішемічних інсультів (II) у дітей, що включає проведення молекулярно-генетичного дослідження генетичної схильності до тромбофілії з вивченням поліморфізму генів MTHFR C677T, FII G20210A, FV G1691 A, який **відрізняється** тим, що додатково проводять дослідження генів: MTHFR A1298C, MTRR A66G, ACE I/D у дітей з II.

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

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