



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **99863** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
A61B 10/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2015 00443	(72) Винахідник(и): Ємець Оксана Вікторівна (UA), Павлик Олена Вікторівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 21.01.2015	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.06.2015	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, бул. Шевченка, 13, м. Київ-4, 01601 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.06.2015, Бюл.№ 12	

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ПЕРЕБІГУ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування перебігу бронхіальної астми шляхом визначення факторів алергічного запалення, причому виявляють поліморфізми генів лізосомного протеолізу в букальному епітелії і при наявності патологічного алеля прогнозують тяжкість перебігу бронхіальної астми.

UA 99863 U

Корисна модель, що заявляється, належить до медицини, зокрема педіатрії, і призначена для прогнозування перебігу бронхіальної астми.

Бронхіальна астма (БА) залишається актуальною медико-соціальною проблемою. За критеріями поширеності тяжкості перебігу, складності у діагностиці, терапії та реабілітації бронхіальна астма займає провідне місце серед "захворювань сторіччя". Це обумовлено підвищенням захворюваності та смертності, раннім початком хвороби, пізнім встановленням діагнозу, багатофакторністю захворювання.

Серед дітей захворюваність на бронхіальну астму складає 5-10 % [2]. Бронхіальна астма асоційована з ризиком інвалідизації та смертності. Дослідження якості життя дітей з алергічними захворюваннями продемонструвало, що при значному фізичному та емоційному навантаженні діти та їхні батьки низько оцінюють якість життя, що підтверджує високий ступінь впливу алергічної патології на соціальну адаптацію дитини [5].

Встановлено, що у ранньому віці частіше хворіють хлопчики, ніж дівчатка (6 % у порівнянні з 3,7 %), однак у пубертатному віці частота захворюваності на бронхіальну астму стає однаковою. У віковому аспекті найбільша поширеність на бронхіальну астму реєструється в шкільному віці. Висока захворюваність на бронхіальну астму у дітей характерна для екологічно несприятливих промислових регіонів. Так, у мешканців міста частіше реєструється бронхіальна астма, ніж у мешканців села (7,1 % та 5,7 % відповідно) [1, 4]. Бронхіальна астма у дітей формується в усіх вікових періодах, однак її дебют частіше відмічається в ранньому віці і в 50-80 % випадків - у дітей віком до 5 років.

На теперішній час значення генетичних факторів в етіопатогенезі бронхіальної астми оцінюється в діапазоні від 36 до 94 % [6, 10, 13]. В даний час проводяться дослідження ролі мутацій і поліморфізмів генів відносно зв'язку генотипу і фенотипу при бронхіальній астмі.

В даний час найбільш поширеним методом вивчення генетичних основ бронхіальної астми є пошук асоціацій захворювання з поліморфізмом кандидатних генів. Наявність поліморфізму може призводити до зміни рівня експресії даних генів і/або зміни структури їх білкових продуктів.

Сучасні дослідження підтверджують наявність взаємозв'язку між порушеннями функціонування протеолітичних систем та розвитком atopічних хвороб [7, 9, 11].

Таким чином, актуальність дослідження полягає в широкому розповсюдженні бронхіальної астми у дітей та значення генетичних факторів в їх розвитку.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, вибраний як прототип, є спосіб діагностики бронхіальної астми та інших atopічних захворювань шляхом визначення загального рівня IgE в сироватці крові (3).

Недоліком цього способу є відсутність об'єктивізації показників IgE за рахунок їх мінливості та залежності від застосування вакцинації, супутніх захворювань та інших патологічних станів.

Задача корисної моделі полягає в оптимізації прогнозування перебігу бронхіальної астми за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

Технічний результат, що вирішується, буде полягати в прогнозуванні ранньої маніфестації та перебігу бронхіальної астми.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі шляхом визначення факторів алергічного запалення, згідно з корисною моделлю, виявляють поліморфізми генів лізосомного протеолізу в букальному епітелії і при наявності патологічного алеля прогнозують тяжкість перебігу бронхіальної астми.

Дані гени кодують білки аутофагії. Аутофагія грає визначальну роль в антигенній презентації на різних етапах, починаючи з тимуса і закінчуючи периферичними лімфоцитами. Так, показано, що макроаутофагія забезпечує обробку протеїнів та транспортування їх до МНС II типу в тимічних епітеліальних клітинах, що є необхідними для позитивної і негативної селекції лімфоцитів у тимусі. При цьому, аутофагія має вплив на інші аспекти імунної відповіді, наприклад, здійснюючи доставку нуклеїнових кислот вірусів до ендосомальних Toll-подібних рецепторів, індукуює прозапальну відповідь в плазмоцитоїдних дендритних клітинах. Важливу роль відіграє аутофагія у дозріванні гранул тучних клітин, їх транслокації, зливанні гранул з мембраною під час, де грануляції [8, 12].

Основною відмінністю способу, що заявляється, є можливість раннього визначення спадкових маркерів, присутніх незалежно від розвитку захворювання та зовнішніх факторів.

За відомими літературними даними такий спосіб невідомий.

Спосіб здійснюється наступним чином:

Було обстежено 96 дітей віком від 5 до 18 років з маніфестацією atopічного маршу (бронхіальна астма, atopічний дерматит та алергічний риніт). Серед обстежених дітей було 57 (59 %) хлопчиків та 39 (41 %) дівчат. Давність захворювання у 11 % дітей становила 1-2 роки, 63 % дітей мали діагноз бронхіальна астма більше 3 років, і у 26 % обстежених діагноз

5 бронхіальна астма поставлений вперше. В анамнезі у 27 % дітей відмічався бронхообструктивний синдром в ранньому віці (1-3 роки). У 100 % дітей мали atopічний дерматит в анамнезі, з них 35 % дітей впродовж останнього часу відмічають прояви atopічного дерматиту у вигляді висипу, сухості шкіри, лущення, свербіжу, ліхенізації. У 34 % дітей прояви atopічного дерматиту відмічались від народження до 1 року, у 16 % до 3 років, у 8 % до 7 років, у 7 % до 10 років, у 5 % прояви з'явилися після року. Інша супутня алергологічна патологія визначалась у 46 % дітей. У 23 % дітей мав місце алергічний риніт: з них 18 % мало цілорічний алергічний риніт, 5 % - сезонний. Серед алергологічних захворювань в анамнезі відмічалась гостра алергічна кропив'янка - 4 % дітей, харчова алергія - 9 % дітей.

10 Сімейний аналіз показав наявність алергічних захворювань у 42 % найближчих родичів обстежених дітей, з них в 60 % випадків - у матері. У 12 % випадків спостерігалась бронхіальна астма, у 10 % алергічний риніт, у 6 % atopічний дерматит, у 3 % гостра кропив'янка, у 10 % харчова алергія.

Таблиця

Структура супутньої алергологічної патології у дітей з бронхіальною астмою

Нозологія	(n = 96)
	%
Персистуючий atopічний дерматит	35
Гостра кропив'янка та набряк Квінке	4
Алергічний риніт	23

15 Першим етапом визначення поліморфізму генів лізосомного протеолізу є виділення ДНК біологічного матеріалу (у нашому дослідженні - з букального зскрібка). Букальний епітелій був виділений з використанням букальної щітки з наступним заморожуванням зразків та їх зберіганням при температурі -20 °C ДНК для генотипування екстрагували із зразків з використанням набору реагентів Diatom™ Prep 200 («Лаборатория Изоген», РФ) відповідно до протоколу виробника. Концентрацію загального ДНК визначали за допомогою NanoDrop спектрофотометра ND1000 (NanoDrop Technologies Inc., США). Використаний метод базується на використанні лізуючого реагенту із гуанідинізоціонатом, який призначений для лізису клітин, солюбілізації клітинного дебрису, а також для денатурації клітинних нуклеаз. В присутності лізуючого реагенту ДНК активно сорбується на NucleoS™-сорбенті, потім легко відмивається від білків та солей спиртовим розчином. Згодом ДНК екстрагують із сорбенту та переносять у стерильні вільні від ДНК та РНК мікропробірки. Отримана ДНК може безпосередньо використовуватися для проведення полімеразної ланцюгової реакції. Набір дозволяє виділяти із свіжого біологічного матеріалу високомолекулярну ДНК (40-50 тисяч пар нуклеотидів високої чистоти (OD_{260/280} нм 1,6-2,0). Вихід чистої ДНК становить 40 мкг. В процесі виділення ДНК ми дотримувалися рекомендацій, наведених у комерційному наборі, та проводили маніпуляції згідно з наступним протоколом.

Протокол виділення ДНК складається з таких етапів:

35 1.1. У пробірку об'ємом 1,5 мл внести 200 мкл досліджуваної проби, додати 400 (800) мкл Лізуючого реагенту та перемішати 5-10 разів та помістити у термостат на 5-7 хв при температурі 65 °C.

1.2. Додати 20-40 мкл суспензії сорбенту NucleoS, який попередньо перемішати до стану гомогенної суспензії на вортексі.

1.3. Пробірку перемістити на ротатор та перемішати 10 хв (10-20 об./хв).

40 1.4. Обережно, не торкаючись осаду, видалили супернатант за допомогою водоструминного насоса.

1.5. До осаду додати 200 (400) мкл Лізуючого реагенту, ретельно перемішати на вортексі до повної гомогенізації. Додати 1 мл робочого розчину Сольового буфера.

45 1.6. Перемішати вміст пробірки шляхом перевертання 5-10 разів. Центрифугувати 10 с при 5000 об./хв. Видалити супернатант, не торкаючись осаду за допомогою водоструминного насоса.

1.7. Додати до пробірки 1 мл Сольового буфера, перемішати вміст за допомогою вортексу, центрифугувати 10 с при 5000 об./хв, обережно видалити супернатант за допомогою водоструминного насоса.

50 1.8. Повторити пункт 1.7.

1.9. Просушити осад у термостаті при температурі 65 °C протягом 4-5 хв.

1.10. У пробірку внести 50-100 мкл ЕкстраГена Е (додавати реагент при постійному перемішуванні).

1.11. Суспензувати вміст пробірки на вортексі 5-10 с до повної гомогенізації, потім помістити у термостат (65 °C) на 4-5 хв.

5 1.12. Повторно суспензувати вміст на вортексі.

1.13. Центрифугувати 1 хв при 10000 об./хв.

1.14. Перенести супернатант з ДНК у чисту пробірку, зберігати при температурі -20 °C.

Визначення поліморфізму rs11121704 гена mTOR та поліморфізм промотора rs510432 гена ATG 5 визначали методом полімеразної ланцюгової реакції (PCR).

10 Реакції ампліфікації проводили з використанням Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, США) в кінцевій реакції об'єм 20 мкл, який містив 2X TaqMan Універсальний Master Mix (Applied Biosystems, США), assay C_910351_10 і матричну ДНК. Ампліфікація фрагментів генів складалася зі стадії денатурації при 95 °C протягом 20 с, а потім 40 циклів ампліфікації при 95 °C протягом 3 с і 60 °C протягом 30 сек. Аналіз даних проводився з 7500 Fast Real-Time PCR Software.

Отримані дані

Розподіл даних генотипів відповідає закону Харді-Вайнберга.

20 Було виявлено, що у 18 (18,4 %) пацієнтів і 45 (46,4 %) дітей з контрольної групи виявлений алель (C/C) гена аутофагії 5 (rs 510432), у 80 (81,6 %) пацієнтів та у 52 (53,6 %) контрольної групи генотип C/T+T/T. Використавши тест хі-квадрат із 2 ступенями свободи вдалося знайти статистично значущі відмінності у розподілі генотипів в групі пацієнтів та контрольній групі ($p < 0,05$).

Таким чином, прогнозування перебігу бронхіальної астми з взяттям до уваги генетичних маркерів значно підвищить ефективність лікування даної групи хворих.

25 Спосіб, що заявляється, був апробований на базі кафедри педіатрії № 2 Національного медичного університету імені О.О. Богомольця. Отримані позитивні результати дозволяють рекомендувати цей спосіб для широкого впровадження в практичну медицину.

Джерела інформації:

30 1. Лапшин, В.Ф. Критерии и сложности диагностики бронхиальной астмы у детей / В.Ф. Лапшин // Здоровье Украины. - 2007. - № 5/1. - С. 40-41.

2. Ласиця О.Л. Алергологія дитячого віку / О.Л. Ласиця, Т.С. Ласиця, С.М. Недельська. - К.: Книга плюс, 2004. - 367 с.

3. Недельская С.Н. Диагностика бронхиальной астмы у детей раннего возраста: возможности, проблемные вопросы, дифференциальная диагностика журнал / С.Н. Недельская, Д.А. Ярцева // Здоровье ребенка. - 2013. - 2 (45).

35 4. Охотникова Е.Н. Основные этапы формирования бронхиальной астмы у детей первых лет жизни / Е.Н. Охотникова // Ліки України. - 2000. - № 4. - С. 23-26.

5. Фещенко Ю.И. Бронхиальная астма / Фещенко Ю.И., Яшина Л.А. // Doctor. - 2004. - № 2. - С. 46-49.

40 6. Hoffjan S, Ober C: Present status on the genetic studies of asthma. Curr Opin Immunol 2002, 14:709-717.

7. Inoue D, Kubo H, Taguchi K, Suzuki T, Komatsu M, et al. (2011) Inducible disruption of autophagy in the lung causes airway hyper-responsiveness. Biochem Biophys Res Commun 405: 13-18

45 8. Jo Eun-Kyeong, YukJae-Min, Shin Dong-Min, Sasakawa C «Roles of autophagy in elimination of intracellular bacterial pathogens» // Frontiers in Immunology May 2013 (4):1-9

9. Jyothula SK, Eissa NT "Autophagy and role in asthma" // Curr Opin Pulm Med 2013, 19:30-35

10. Kere J, Laitinen T: Positionally cloned susceptibility genes in allergy and asthma. Curr Opin Immunol 2004, 16:689-694.

50 11. Nakano H, Ushio H «An unexpected role for autophagy in degranulation of mast cells» // Autophagy 7:6, 657-659; June 2011

12. Nedjic J, Aichinger M, Emmerich J, Mizushima N, Klein L. Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. // Nature. 2008 Sep 18; 455 (7211):396-400.

55 13. Ober C, Hoffjan S: Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. Genes Immun 2006, 7:95-100.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозування перебігу бронхіальної астми шляхом визначення факторів алергічного запалення, який **відрізняється** тим, що виявляють поліморфізми генів лізосомного протеолізу в
 5 букальному епітелії і при наявності патологічного алеля прогнозують тяжкість перебігу бронхіальної астми.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

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

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