



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **110915** (13) **C2**
(51) МПК (2016.01)
G01N 33/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2015 06021</p> <p>(22) Дата подання заявки: 18.06.2015</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.02.2016</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 10.12.2015, Бюл.№ 23</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.02.2016, Бюл.№ 4</p> <p>(72) Винахідник(и): Євтушенко Денис Олександрович (UA), Бойко Валерій Володимирович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, пр. Леніна, 4, м. Харків, 61022 (UA)</p> <p>(74) Представник: Євтушенко Тамара Григорівна</p>	<p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Покидько М.І. Патоморфогенез, клініка, діагностика та лікування спайкової хвороби на основі визначення індивідуальної судинної реактивності організму (клініко-експериментальне дослідження): автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.01.03/ М.І. Покидько; Нац. мед. ун-т ім. О.О.Богомольця.- К., 2002 RU 2269133 C2, 27.01.2006 Microarray expression profiling in adhesion and normal peritoneal tissues/ Dana R. Ambler, D.O., Alicia M. Golden et al. // Fertility and sterility, 2012. - Volume 97, Issue 5, Pages 1158–1164. Суфияров И.Ф. Система комплексной интраоперационной профилактики спаечной болезни брюшины (клинико-экспериментальное исследование): автореф. дисс. ... д-ра. мед. наук: 14.01.17 / И.Ф.Суфияров; Башкирский государственный медицинский университет.- УФА, 2010. Шевчук О.М. Лапароскопичний метод профілактики та лікування абдомінального спайкоутворення: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.03/ О.М. Шевчук; Вінницький нац. мед. ун-т ім. М.І.Пирогова.- Вінниця, 2011. Прогностические возможности использования иммуногенетических маркеров при спаечной болезни брюшной полости / О.М. Маршава, Л.Т. Тохадзе, Л.Д. Лагвилава и др.// Клінічна хірургія. - 2006. - N10. - С. 18-19</p>
--	--

UA 110915 C2

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ СПАЙКОВОЇ ХВОРОБИ ОЧЕРЕВИНИ

(57) Реферат:

Винахід належить до способу прогнозування спайкової хвороби очеревини шляхом виділення з проби крові дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) і проведення генотипування поліморфізму гена методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), причому виявляють поліморфізм гена ITGA 2 шляхом виділення з лейкоцитів цільної крові геномної ДНК методом ПЛР за допомогою набору реагентів для ампліфікації "SNP-ЕКСПРЕС-РВ", аналіз проводять за допомогою реагенту "ДНК-експрес-кров", і за наявності гетерозиготи СТ або гомозиготи СС прогнозують розвиток спайкової хвороби очеревини.

Винахід належить до медицини, а саме до абдомінальної хірургії, і може бути використаним для прогнозування спайкової хвороби очеревини (СХО).

За даними різних авторів більш ніж у 55 % пацієнтів, які перенесли в анамнезі абдомінальне хірургічне втручання, в післяопераційному періоді розвивається спайковий процес черевної порожнини, який здатний привести до такого важкого ускладнення як спайкова кишкова непрохідність, а повторні операції збільшують ризик утворення спайок та їх ускладнень [Костырной А.В. Спаечная болезнь брюшины: настоящее и будущее проблемы / А.В. Костырной, К.Л. Гройзик, С.Р. Мустафаева // Таврический медико-биологический вестник. - 2013. - Т. 16, № 1-3 (61). - С. 262-267; Диагностика, лечение и профилактика спаечной болезни брюшины / П.К. Холматов, Ш.К. Назаров, Б.Н. Джонов, Ф. Комилов // Вестник Авиценны. - 2012. - № 1 (50). - С. 155-160].

До теперішнього часу поки ще немає достатньо об'єктивних методів прогнозування виникнення післяопераційних спайок в черевній порожнині. У цьому зв'язку особливу актуальність представляє використання прогностичних критеріїв. Широко використовують наступні інтраопераційні фактори, що сприяють утворенню післяопераційних спайок: ішемія, висихання поверхні очеревини, накладення швів, кетгуттові або хромовані шви, натяг очеревини, згустки крові, що залишилися в черевній порожнині, тривала операція, використання грубих інструментів при операціях. Наявність цих факторів, а також зовнішній вигляд і протяжність післяопераційного рубця дають можливість в деякій мірі прогнозувати розвиток спайкових ускладнень [Чекмазов И.А. Спаечная болезнь брюшины: руководство / И.А.Чекмазов. - М.: Гэотар-Медиа, 2008. - 160 с.; Запорожец А.А. Причины возникновения спаек брюшины после первичных асептических операций на желудочно-кишечном тракте и метод их профилактики / А.А. Запорожец // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. - 2011. - Т. 170, № 2. - С. 14-20].

Деякі автори вважають, що в патогенезі розвитку спайок головна роль належить спадковій схильності [Магалашвили Р.Д. Диагностика предрасположенности, профилактика и лечение спаечной болезни: автореф. дис. ... докт. мед. наук / Р.Д. Магалашвили. - Москва, 1991. - 39 с.]. В цьому напрямку було розроблено спосіб прогнозування спайкової хвороби у дітей, які перенесли оперативні втручання на органах черевної порожнини.

Суть винаходу полягає в тому, що з лімфоцитів периферичної венозної крові виділяють дезоксирибонуклеїнову кислоту (ДНК), проводять генотипування поліморфізму NAT2 методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і при виявленні одного з генотипів NAN2*4/*4, NAT2*4/*5, NAT2*4/*6, NAT2*4/*7 прогноують ризик розвитку спайкової хвороби очеревини у обстежуваного [Пат. № 2269133 Росія, МПК G01N 33/53. Способ прогнозирования спаечной болезни у детей, перенесших оперативные вмешательства на органах брюшной полости / Викторова Т.В., Викторов В.В., Комаров О.А., Макушин А.А., Данилко К.В., Гадельшин Э.С.; ГОУ ВПО БГМУ Минздрава России. - 3. № 2005103199/15; заявл. 08.02.2005; опубл. 27.01.2006].

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

В основу винаходу поставлена задача розширення арсеналу ефективних способів прогнозування спайкової хвороби очеревини.

Задачу, яку поставлено в основу винаходу, вирішують тим, що у відомому способі прогнозування спайкової хвороби очеревини шляхом виділення з проби крові ДНК і проведення генотипування поліморфізму гена методом ПЛР, згідно з винаходом, виявляють поліморфізм гена ITGA 2 шляхом виділення методом ПЛР за допомогою набору реагентів для ампліфікації "SNP-ЕКСПРЕС-РВ" з лейкоцитів цільної крові геномної ДНК, аналіз якої проводять за допомогою реагенту "ДНК-експрес-кров", і за наявності гетерозиготи СТ або гомозиготи СС прогноують розвиток спайкової хвороби очеревини.

Технічний ефект винаходу, а саме розширення арсеналу ефективних способів прогнозування спайкової хвороби очеревини, обумовлений синергізмом заходів технології, що заявляється.

Спосіб виконують наступним чином: виявляють поліморфізм гена ITGA 2 шляхом виділення методом ПЛР за допомогою набору реагентів для ампліфікації "SNP-ЕКСПРЕС-РВ" з лейкоцитів цільної крові геномної ДНК, аналіз якої проводять за допомогою реагенту "ДНК-експрес-кров", і за наявності гетерозиготи СТ або гомозиготи СС прогноують розвиток спайкової хвороби очеревини.

Теоретичною передумовою технології, яка заявляється, послужив той факт, що альфа-2 інтегрин ITGA 2 бере активну участь у регуляції експресії генів колагену і колагенази, що в свою чергу впливає на процеси утворення позаклітинного матриксу. Цей інтегрин має трансмембранний фрагмент, що забезпечує адгезію, і внутрішньоклітинний фрагмент, який

бере участь в регуляції генів колагену. Ген ITGA 2 локалізований у 5 хромосомі, мутації цього гена можуть бути у вигляді заміни нуклеотиду цитозину (С) на тимін (Т) у позиції 807 ділянки послідовності ДНК гена ITGA 2, ця мутація призводить до заміни амінокислоти в пептидному ланцюзі молекули альфа-2 - субодиниці інтегринів. Даний поліморфізм позначається як генетичний маркер С807Т. Популяційна частота алеля Т, яка зустрічається, в Європейській популяції, становить близько 40 %.

Ефективність способу доведена клінічними дослідженнями.

50 пацієнтів з хірургічної абдомінальної патологією досліджуваної популяційної вибірки, залежно від виявленого синдрому комплексу класифікували на 3 групи: 1-а група - 18 осіб (36 % від усієї популяційної вибірки), що мають одиничні симптоми СХО; 2-а група - 14 осіб (28 %) - хворі, які мають не більше двох симптомів СХО; 3-я група 11 осіб (22 %) - хворі з трьома і більше симптомами СХО, 7 хворих (14 %) - вперше оперовані на органах черевної порожнини.

Виявлення мутацій гена ITGA-2 в геномі пацієнтів визначали методом ПЛР за допомогою набору реагентів для ампліфікації "SNP-ЕКСПРЕС-РВ". Проводили аналіз геномної ДНК, виділеної з лейкоцитів цільної крові пацієнтів, за допомогою спеціального реагенту "ДНК-експрес-кров". Зразки крові центрифугували при 3000 об/хв, отримували осад формених елементів, який витримували при -20 °С до повного заморожування. Після розморожування зразків у пробірки вносили реагент "ДНК-експрес-кров". Потім прогрівали при 99 °С протягом 15 хв. Зразки центрифугували при 8000 об/хв... протягом 1 хвилини, отриманий супернатант використовували як досліджуваний зразок ДНК. При виконанні ПЛР для отримання реагентів ампліфікації готували реакційні суміші алеля 1 і алеля 2. Зразок виділеної ДНК ампліфікували з двома парами алель-специфічних праймерів. Досліджувані зразки вносили у пробірки з робочою ампліфікаційною сумішшю: алель 1 і алель 2 відповідно. В якості негативного контрольного зразка використовували розчинник, в якості позитивного контролю - позитивний контроль ДНК. Детекцію продуктів ПЛР проводили, використовуючи програмований ампліфікатор, поєднаний з оптичною системою детекції флуоресцентного сигналу. Використовували інтеркалюючий барвник Green, який флуоресцює при вбудовуванні в дволанцюговий продукт ДНК, що утворюється. При цьому використовували FRET-зонди. Система дозволяє проводити ПЛР і реєструвати сигнал від зразків за заданими каналами. За кривими накопичення флуоресцентного сигналу виконували аналіз результатів. Для проведення ампліфікації використовували позитивний і негативний контрольні зразки ДНК.

У 50 пацієнтів з абдомінальної патологією досліджували частоту можливих точкових мутацій заміни пар основ цитозину (С) на тимін (Т) в послідовності гена ITGA 2.

Розподіл пацієнтів з абдомінальної патологією з наявністю гапло- і диплотипів заміни пар основ цитозину (С) на тимін (Т) представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Частота мутації гена ITGA 2, яка зустрічається у хворих з абдомінальної патологією

Пацієнти з абдомінальною патологією	Гомозигота СС	Гетерозигота СТ	Гомозигота ТТ
Абсолютна кількість пацієнтів (n=50)	17	29	4
Частота, з якою зустрічається, %	34 %	58 %	8 %

Нормальний диплотип СС гена ITGA 2 виявили у 17 пацієнтів з абдомінальної патологією, що склало 34 %.

Мутантний диплотип і гаплотип виділили у 33 обстежуваних хворих з хірургічною абдомінальної патологією, що склало 66 %.

Максимальна частота (58 %), з якою зустрічаються гаплотипи СТ, була виявлена у 29 пацієнтів. Диплотип ТТ зустрічався рідше серед обстежених пацієнтів (4), що склало 8 %.

Таким чином, у 29 обстежених пацієнтів виявили поодинокі заміни основ цитозину на тимін (СТ), що склало 58 %. Заміна обох основ на тимін - (ТТ) була виявлена тільки у 4 пацієнтів (табл. 1). Отже, найбільша частота - 58 % серед обстежених пацієнтів, припадала на мутантний гаплотип СТ, а мутантні диплотипи ТТ зустрічалися тільки у 8 % випадків обстежень.

У 43 обстежених пацієнтів з 50 виявлено ознаки СХО. Генетичний поліморфізм гена ITGA 2 вивчали у 43 хворих, які були оперовані за показаннями на органах черевної порожнини.

Частота мутації гена ITGA 2, яка зустрічається у хворих з абдомінальної патологією, оперованих на органах черевної порожнини

Пацієнти з абдомінальною патологією	Гомозигота СС	Гетерозигота СТ	Гомозигота ТТ
Абсолютна кількість пацієнтів (n=43)	15	24	4
Частота, з якою зустрічається, %	34,8 %	55,8 %	9,4 %

5 Аналіз частоти наявних точкових мутацій виявили у 28 пацієнтів з СХО, що склало 64,2 % від усієї вибірки. У 15 пацієнтів, що склало 34,8 % вибірки, не виявили точкові мутації заміни С на Т в гені ITGA 2. Мутації гена ITGA 2 виявлені в гетерозиготному стані (СТ) у 24 хворих, що склало 55,8 %. Мутації в гомозиготному стані при заміні основ СС на ТТ були ідентифіковані тільки у 4 хворих, що склало 9,4 %. Найбільш тяжкі прояви СХО були виявлені у пацієнтів з подвійною заміною основ ТТ.

10 Таким чином, при наявності 2 мутантних алелів гена ITGA 2 у пацієнтів з спайковою хворобою очеревини, кількість симптомів, що характеризують тяжкий перебіг СХО, була максимальною. Аналіз результатів обстеження генетичних факторів у хворих з різним ступенем тяжкості і поширеності спайкової хвороби свідчить про наявність взаємозв'язку вираженого поліморфізму гена ITGA 2, ступеня вираженості імунopatологічних реакцій і тяжкості прояву синдромукомплексу спайкової хвороби. У групі С-С з нормальними алелями гена, очевидно, ключова роль у патогенезі належить іншим факторам метаболізму. У групі С-Т, можливо, мають місце полігенні порушення.

15 Таким чином, аналіз результатів генетичних обстежень у хворих з різним ступенем тяжкості спайкової хвороби свідчить про наявність взаємозв'язку вираженого поліморфізму гена ITGA 2, ступеня вираженості імунopatологічних реакцій і тяжкості прояву синдромукомплексу спайкової хвороби.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

25 Спосіб прогнозування спайкової хвороби очеревини шляхом виділення з проби крові дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) і проведення генотипування поліморфізму гена методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), який **відрізняється** тим, що виявляють поліморфізм гена ITGA 2 шляхом виділення з лейкоцитів цільної крові геномної ДНК методом ПЛР за допомогою набору реагентів для ампліфікації "SNP-ЕКСПРЕС-РВ", аналіз проводять за допомогою реагенту "ДНК-експрес-кров", і за наявності гетерозиготи СТ або гомозиготи СС
30 прогнозують розвиток спайкової хвороби очеревини.