



МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118860** (13) **U**  
(51) МПК  
**G01N 33/48** (2006.01)

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

(21) Номер заявки: <b>u 2017 02977</b>	(72) Винахідник(и): <b>Ткаченко Марина Вікторівна (UA), Назарян Розана Степанівна (UA), Піонтковська Оксана Володимирівна (UA), Волкова Наталя Євгенівна (UA), Шевчук Віктор Альбертович (UA), Одушкіна Наталія Вікторівна (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>29.03.2017</b>	(73) Власник(и): <b>ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, просп. Науки, 4, м. Харків, 61022 (UA)</b>
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>28.08.2017</b>	(74) Представник: <b>Голданська Анна Вадимівна</b>
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>28.08.2017, Бюл.№ 16</b>	

**(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ СХИЛЬНОСТІ ДО ХРОНІЧНОГО ГЕНЕРАЛІЗОВАНОГО КАТАРАЛЬНОГО ГІНГІВІТУ У ДІТЕЙ, ХВОРИХ НА МУКОВІСЦИДОЗ**

**(57) Реферат:**

Спосіб діагностики схильності до хронічного генералізованого катарального гінгівіту у дітей, хворих на муковісцидоз, включає забір біологічного зразку, виділення ДНК та типування поліморфізму гена MUC5B. Також беруть зразок букального епітелію, виділяють ДНК, типування VNTR поліморфізму гена MUC5B виконують з використанням праймерів для ампліфікації MUC5B F - 5'-AGTGTGCAGTGA CTGGCGAG-3', та MUC5B R - 5'-CTAGAGTTGCAGGTGGCAGG-3', візуалізують в агарозному гелі інтрон 36 гена MUC5B з наступним визначенням повторів 59 пар нуклеотидів і при виявленні 6 або 9 повторів діагностують схильність до хронічного генералізованого катарального гінгівіту.

**UA 118860 U**

Корисна модель належить до медицини, а саме до дитячої стоматології, і може бути використана для діагностики схильності до хронічного генералізованого катарального гінгівіту у дітей, хворих на муковісцидоз.

Хвороби пародонту - одна з важливих проблем сучасної стоматології, особливо у дітей, які мають соматичне захворювання. На сьогодні особливої актуальності набуває визначення генетичної обумовленості розвитку патологічних процесів. Генетичні чинники доповнюють перелік факторів ризику захворювань, що реалізуються під впливом несприятливих обставин. Вивчення поліморфізму генів, асоційованих із захворюваннями, зокрема органів ротової порожнини, дозволяє пояснити патогенетично пов'язані механізми та використовувати результати досліджень як прогностичні маркери хвороби [Особливості морфологічної будови ясен у нормі та при хронічних гінгівітах: навч. посіб. /П.А. Гасюк, Н.В. Гасюк. - Тернопіль: ТДМУ, 2014. - 92 с.; Исамулаева А.З. Клинико-генетический анализ как метод прогнозирования развития патологий пародонта у пациентов с язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки / А.З. Исамулаева, А.А. Кунин // Институт стоматологии. - 2015. - № 2 (67). - С. 54-57].

При виникненні соматичної патології, зокрема захворювань дихальної системи, або під дією певних видів мікроорганізмів відбувається гіперсекреція муцинів та зміна компонентного складу слизу. У порожнині рота найбільш значимим підтипом родини муцинів є ген MUC5B. Доведено, що продукція муцину MUC5B залозами підслизового шару посилюється у хворих на муковісцидоз. Ці процеси призводять до утворення слизу підвищеної в'язкості, порушення його функцій та порушення евакуації. У хворих розвиваються вторинні зміни у багатьох органах і системах.

Особливості структури гена MUC5B можуть бути маркерами діагностики схильності до хвороб пародонту [Коваленко С.В. Вплив персистувального запалення при хронічному обструктивному захворюванні легень на стан слизових бар'єрів бронхів і кишечника (огляд літератури) /С.В. Коваленко // Буковинський медичний вісник. - 2014. - Т. 18, № 4. - С 200-204; Rose M.C. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease / M.C. Rose, J.A. Voynow // Physiol Rev. - 2006. - Vol. 86. - P. 245-278].

Даний спосіб діагностики схильності до хвороб пародонту є найбільш близьким до того, що запропоновано, за технічною суттю і результатом, що досягається, тому його вибрано як найближчий аналог.

Відомо, що продукція муцину MUC5B залозами підслизового шару посилюється у хворих на муковісцидоз, з іншого боку, особливості структури гена MUC5B можуть бути маркерами ранньої діагностики схильності до хвороб пародонту. Однак, при оцінці рівня медицини автори не виявили способу діагностики схильності до катарального генералізованого гінгівіту у дітей, хворих на муковісцидоз, на підставі аналізу генетичного поліморфізму гена MUC5B.

В основу корисної моделі поставлена задача розробки способу діагностики схильності до хронічного генералізованого катарального гінгівіту у дітей, хворих на муковісцидоз.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі діагностики схильності до хвороб пародонту, що включає забір біологічного зразку, виділення ДНК та типування поліморфізму гена MUC5B, відповідно корисній моделі, для діагностики схильності до хронічного катарального генералізованого гінгівіту у дітей, хворих на муковісцидоз, беруть зразок букального епітелію, виділяють ДНК, типування VNTR поліморфізму гена MUC5B виконують з використанням праймерів для ампліфікації MUC5B F-5'AGTGTGCAGTGAAGTGGCGAG-3' та MUC5B R-5'-CTAGAGTTGCAGGTGGCAGG-3', візуалізують в агарозному гелі інтрон 36 гена MUC5B з наступним визначенням повторів 59 пар нуклеотидів і при виявленні 6 або 9 повторів діагностують схильність до хронічного генералізованого катарального гінгівіту.

Технічний результат досягається за рахунок, синергізму ознак, що характеризують запропоновану корисну модель.

Спосіб виконують наступним чином: беруть зразок букального епітелію, виділяють ДНК, типування VNTR поліморфізму гена MUC5B виконують з використанням праймерів MUC5B F-5'AGTGTGCAGTGAAGTGGCGAG-3' та MUC5B R-5'-CTAGAGTTGCAGGTGGCAGG-3' для ампліфікації, візуалізують в агарозному гелі інтрон 36 гена MUC5B з наступним визначенням повторів 59 пар нуклеотидів і при виявленні 6 або 9 повторів діагностують схильність до хронічного генералізованого гінгівіту.

Структурний ген білка MUC5B локалізований у 11p15.5 хромосомі. Сам білок суттєво варіює за розміром (від  $2 \times 10^6$  kDa до  $30 \times 10^6$  kDa) та представляє собою масу переплетених філаментоподібних структур. Ген MUC5B складається з 48 екзонів та 47 інтронів. Він містить достатньо великий центральний екзон 30 (10713 п.н.) та низку прямих послідовних повторів 59 п.н. (послідовність - cctgtgcggt gagtgggggc ggccccgggc cccccagacc cctcggcctc tctgagtgt) у інтроні

36 [Desseyn J.-L. Fifty-nine bp repeat polymorphism in the uncommon intron 36 °F the human mucin gene MUC5B / J.-L. Desseyn, K. Rousseau, A. Laine // Electrophoresis. - 1999. - V. 20. - P. 493-496]. Саме останній поліморфізм може бути використаний як потенційний маркер.

Ефективність способу доведена клініко-лабораторними дослідженнями.

- 5 Забір біоматеріалу для дослідження проводили під час стоматологічного обстеження за допомогою стерильного одноразового зонду в індивідуальному пакуванні з маркуванням.

Для проведення генотипування з клітин букального епітелію виділяли ДНК за допомогою комерційного набору Diatom™ DNA Prep 100 (Російська Федерація), відповідно до інструкції виробника.

- 10 Типування VNTR поліморфізму в інтроні 36 гена MUC5B виконували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з детекцією ампліфікованих фрагментів в агарозному гелі. Для ампліфікації використовували праймери: MUC5B F-5'-AGTGTGCAGTGACTGGCGAG-3' та MUC5B R-5'-CTAGAGTTGCAGGTGGCAGG-3'. Для проведення ПЛР алелей гена MUC5B використовували автоматичний термоциклер "Терцик" (Російська Федерація) та комерційні набори реагентів GenPak™ PCR Core (0,5 мл) (Російська Федерація), відповідно до інструкцій виробників. Розміри фрагментів визначали у порівнянні з маркером молекулярної маси pUC19 DNA/Mspl (HpaII) Marker, 23 (Thermo Fisher Scientific Inc.). Розрахунки здійснювали за допомогою програмного забезпечення Statistica 8.0.

- 20 Можливість використання запропонованого способу для діагностики схильності до хронічного генералізованого катарального гінгівіту на підставі використання поліморфізму гена MUC5B підтверджено результатом спостереження 48 дітей, 25 з яких (основна група), мають діагноз муковісцидоз.

- За результатами клінічного обстеження 5-й дітям з муковісцидозом встановлено легкий ступінь, 12-ти хворим - середній ступінь, 8-ми хворим - тяжкий ступінь хронічного генералізованого катарального гінгівіту.

- 25 На наступному етапі дослідження для пацієнтів основної групи встановлювали, чи є асоціація між ступенем тяжкості хронічного генералізованого катарального гінгівіту та наявністю у генотипі певної алелі гена MUC5B. Порівнювали підгрупи з середнім та тяжким ступенем розвитку гінгівіту. Використовували критерій Манна-Уїтні.

- 30 Встановили, що для пацієнтів з муковісцидозом наявність в генотипі алеля гена MUC5B з 9-ма повторами ( $U=9,5$ ,  $p<0,05$ ) може вказувати на схильність до хронічного генералізованого катарального гінгівіту легкого ступеня. Серед хворих на муковісцидоз дітей із середнім ступенем розвитку хронічного генералізованого катарального гінгівіту переважають ( $U=22,0$ ,  $p<0,05$ ) носії алелі гена MUC5B з 6-ма повторами 59 п.н. у інтроні 36. Серед цих пацієнтів, для яких доведено носійство алелі гена MUC5B з 6-ма повторами переважають такі, в яких спостерігається середній ступінь розвитку хронічного генералізованого катарального гінгівіту:  $U=23,5$ ,  $p<0,05$ . Наявність у генотипі алелі гена з різною кількістю повторів може бути використана для діагностики схильності пацієнта з муковісцидозом до хронічного генералізованого катарального гінгівіту. Алель гена MUC5B з 6-ма або 9-ма повторами 59 п.н. в інтроні 36 може бути
- 40 запропонований як потенційний маркер ризику розвитку хронічного генералізованого катарального гінгівіту.

- Здійснення запропонованого способу дозволяє формувати групи ризику з метою диференційованого призначення профілактичних, лікувальних заходів та динамічного спостереження за станом пародонту дітей, хворих на муковісцидоз.

45

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- Спосіб діагностики схильності до хронічного генералізованого катарального гінгівіту у дітей, хворих на муковісцидоз, що включає забір біологічного зразку, виділення ДНК та типування поліморфізму гена MUC5B, який **відрізняється** тим, що додатково беруть зразок букального епітелію, виділяють ДНК, типування VNTR поліморфізму гена MUC5B виконують з використанням праймерів для ампліфікації MUC5B F - 5'-AGTGTGCAGTGACTGGCGAG-3', та MUC5B R - 5'-CTAGAGTTGCAGGTGGCAGG-3', візуалізують в агарозному гелі інtron 36 гена MUC5B з наступним визначенням повторів 59 пар нуклеотидів і при виявленні 6 або 9 повторів
- 55 діагностують схильність до хронічного генералізованого катарального гінгівіту.

60