



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **93849** (13) **U**
(51) МПК (2014.01)
A61B 5/00
G01N 1/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 07316	(72) Винахідник(и): Кайдашев Ігор Петрович (UA), Шликова Оксана Анатоліївна (UA), Весніна Людмила Едуардівна (UA), Труфанова Валентина Петрівна (UA), Ткаченко Ірина Михайлівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 10.06.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 27.10.2014	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 27.10.2014, Бюл.№ 20	(73) Власник(и): ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД УКРАЇНИ "УКРАЇНСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ", вул. Шевченка, 23, м. Полтава, 36024 (UA)

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ОДНОНУКЛЕОТИДНИХ ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНА МАТРИКСНОЇ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗИ 20

(57) Реферат:

Спосіб визначення однонуклеотидних поліморфізмів гена матриксної металопротеїнази 20 включає молекулярно-біологічний метод одночасного виявлення наявності "дикої" та мутантної алелі гена за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу. Врахування результатів ведуть з аналізом кривих плавлення ДНК дуплексів та флуоресцентною реєстрацією накопичення ДНК за флуоресцентними барвниками.

UA 93849 U

Спосіб належить до медицини, а саме до стоматології, лабораторної діагностики, і може бути використаний для визначення однонуклеотидних поліморфізмів (ОНП) гена матричної металопротеїнази 20 (MMP20) з метою прогнозування виникнення пошкоджень емалі та розробки методів профілактики розвитку патологічних станів твердих тканин зубів.

Дослідження останніх десятирічч показали, що енамелізин (MMP-20) є основним ферментом емалевої матриці. Його концентрація і прояв ініціюється перед початком мінералізації дентину і триває протягом секреторної стадії амелогенезу. Таким чином діяльність цього ферменту має вирішальне значення для правильного формування емалі. Існують відомості, щодо дослідження питання, про те, що морфологія зубів, переважно, зумовлена спадковими факторами, а процес дентиногенезу регулюється багатьма генами, а саме матриксними металопротеїназами. Зміна структури цих генів, внаслідок поліморфізму, може призводити до розвитку різноманітних патологічних станів твердих тканин зубів [Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation./ Lu Y, Papagerakis P, Yamakoshi Y, Hu JC, Bartlett JD, Simmer JP.// Biol Chem. 2008 Jun; 389(6):695-700.] Існує ряд способів виявлення однонуклеотидних поліморфізмів генів. Всі вони ґрунтуються на використанні полімеразної ланцюгової реакції або з наступним рестрикційним аналізом (ПЛР-ПДРФ), або стандартної алель-специфічної ПЛР з використанням двох пар специфічних олігонуклеотидних праймерів до "диких" та мутантних алелей та детекцією продуктів ампліфікації електрофоретичним методом. Методи визначення поліморфізмів генів, що наведені, відрізняються багатостадійністю та трудомісткістю процесу аналізу, передбачають використання токсичних реагентів. Це стосується, наприклад, акриламідів, що використовуються для приготування поліакриламідного геля для електрофоретичного розділення фрагментів, що отримані в реакції ампліфікації відповідної ділянки гена MMP-20.

До аналогів способу, що заявляється, можна віднести метод визначення поліморфізму гена екстрацелюлярного матриксу - еластину, суть якого полягає в визначенні наявності мутантної алелі методом ПЛР-техніки радіоактивного мічення (Напоп О. Aging, carotid artery distensibility, and the Ser422Gly elastin gene polymorphism in humans/ O. Napop, Vu Luong, J.J. Mourad et al.// Hypertension. - 2001. - Vol. 38. - P. 1185-1189). Однак, недоліками даного методу є використання радіоактивних компонентів, що потребує особливого технічного обладнання. Тому, направленість досліджень повинна бути спрямована на пошук та розробку економічно вигідних, сучасних та не трудомістких, надійних методів виявлення однонуклеотидних поліморфізмів, що можуть бути пов'язані з патологією твердих тканин зубів.

Найбільш близьким до запропонованого способу є метод (Kim J.W. MMP-20 mutation in autosomal recessive pigmented hypomaturational amelogenesis imperfecta/ J.W. Kim, J.P. Simmer, T.C Hart et al.// J. Med Genet. - 2005. - Vol. 42. - P. 271-275), суть якого полягає у пошуку точкових мутацій гену MMP-20 шляхом секвенування дволанцюгових молекул ДНК, що складається з ампліфікації ДНК методом ПЛР, очищення продукту ампліфікації в гелі та секвенування. Цей метод дозволяє проводити аналіз значної кількості мутацій, що відповідають декільком інтронам та екзонам великого гена.

Недоліками даного методу є, перш за все, висока собівартість реактивів та обладнання, що використовується, складність в інтерпретації отриманих результатів, що не дає можливості широкого використання його для виявлення однонуклеотидних поліморфізмів гена MMP-20 в епідеміологічній та загальноклінічній практиці.

В основу корисної моделі поставлена задача створення способу визначення однонуклеотидних поліморфізмів гена MMP-20, що дозволяє визначити генетичні детермінанти розвитку структурних змін компонентів твердих тканин зубів, а саме емалі, з метою ранньої діагностики патологічних змін її формування та розвитку, визначення прогнозу та показань для окремих препаратів і вибору правильної лікувальної тактики.

Поставлена задача вирішують створенням способу визначення однонуклеотидних поліморфізмів гена матричної металопротеїнази 20, який включає молекулярно-біологічний метод одночасного виявлення наявності "дикої" та мутантної алелі гена за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу, який відрізняється від відомого тим, що врахування результатів ведуть з аналізом кривих плавлення ДНК дуплексів та флуоресцентною реєстрацією накопичення ДНК за флуоресцентними барвниками.

Спосіб реалізується таким чином: проводять виділення геномної ДНК з букального епітелію та венозної крові обстежуваних за допомогою набору "ДНК-експрес" (ООО НПФ "Литех", Росія). Мутантний та "дикий" тип алелей гена MMP-20 ампліфікують за допомогою ПЛР в 25 мкл реакційної суміші, що містить: суміш дезоксинуклеозидтрифосфатів 2,5 mM кожного, 10 × ПЛР-буфер з барвником SYBR Green I, 25 mM MgCl₂, 5 Е/мкл Tag-ДНК полімерази з антитілами, що інгібують активність фермента, 5 пкмоль специфічних праймерів: sens-wild 5-CCC GCT CCA GAA AAT CCT-3'; sens-mut 5'-GCC CCC GCT CCA GAA AAT CCA-3', загальний праймер anti-sens

5-GCC AAA CAG CAA GAC TCC AT-3' та 5 пкмоль праймерів: up 5'-GCT CTC TCA TAT TGT CTA GGT TT-3'; low 5'-CTG ATG GGT CTG TGG A AT GGG-3'; 5 пкмоль проб: (FAM) CTG CTC ATG AAT TTG GCC AT-(BHQ1); (R6G) TGC TCA AGA ATT TGG CCA TG-(BHQ2).

5 Геномну ДНК обстежуваних додають до суміші в кількості 20-50 нг. Ампліфікацію поліморфної ділянки гена MMP-20 проводять на детектувальному ампліфікаторі ДТ-322 (ООО "НПО ДНК-Технология", Росія) в режимі реального часу з кінцевим аналізом кривих плавлення ДНК дуплексів та реєстрації результатів накопичення ДНК за флуоресцентними барвниками.

10 Приклад практичного використання способу. Проведено визначення поширеності поліморфізму g30561A→T гена MMP-20 серед дітей із флюорозом. За результатами молекулярно-генетичного аналізу "дикий тип" алелі знайдено у 88 пацієнтів. Мутантний тип алелі гена MMP-20 виявили у 3 пацієнтів, що складає 96,7 % і 3,3 %, відповідно. Пацієнти, у яких виявлено генетичний поліморфізм гена MMP-20, клінічно характеризувалися флюорозом емалі 5-го ступеня тяжкості. Встановлено достовірний прямий кореляційний зв'язок між ступенем тяжкості флюорозу і поліморфізмом гена MMP-20 g30561A→T (Тау Кандела 0,16; р<0,05), що відображає вплив поліморфізму гена MMP-20 на обтяження розвитку ендемічного флюорозу.

20 Досліджена частота зустрічності поліморфізму g.16250 T>A гена MMP-20 у пацієнтів з підвищеною стертістю зубів. З усієї когорти досліджених, незалежно від ступеня тяжкості підвищеної стертості зубів, в 98,6 % зустрічається "дикий тип" генотипу гена MMP-20 та лише у 1 пацієнта, саме з тяжким III ступенем підвищеної стертості зубів, спостерігається наявність мутантної алелі А поліморфізму g.16250 T>A гена MMP-20.

Таким чином, за допомогою способу, що заявляється, доцільно визначати наявність мутантних алелів одонуклеотидних поліморфізмів гена MMP-20.

25 Визначення одонуклеотидних поліморфізмів гена MMP-20, за допомогою даного способу, є зручним у використанні, інформативним, високоспецифічним, дозволить забезпечити об'єктивне, надійне та точне визначення даних поліморфізмів, що допоможе точніше прогнозувати та контролювати перебіг захворювань, які пов'язані з деструктивними змінами тканин зубів.

30 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення одонуклеотидних поліморфізмів гена матричної металопротеїнази 20, який включає молекулярно-біологічний метод одночасного виявлення наявності "дикої" та мутантної алелі гена за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу, який 35 **відрізняється** тим, що врахування результатів ведуть з аналізом кривих плавлення ДНК дуплексів та флуоресцентною реєстрацією накопичення ДНК за флуоресцентними барвниками.

Комп'ютерна верстка С. Чулій

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