



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **79300** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
A61B 10/00
G01N 33/50 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

| | |
|---|--|
| <p>(21) Номер заявки: u 2012 06637</p> <p>(22) Дата подання заявки: 31.05.2012</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.04.2013</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.04.2013, Бюл.№ 8</p> | <p>(72) Винахідник(и): Кайдашев Ігор Петрович (UA), Левченко Лілія Юрївна (UA), Ізмайлова Ольга Ваталіївна (UA), Шликова Оксана Анатоліївна (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД УКРАЇНИ "УКРАЇНСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ", вул. Шевченка, 23, м. Полтава, 36024 (UA)</p> |
|---|--|

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ПЕРЕБІГУ АТОПІЧНОГО ДЕРМАТИТУ У ДІТЕЙ

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування перебігу atopічного дерматиту у дітей включає ідентифікацію ділянок геному, з якими асоціюється розвиток та перебіг захворювання.

UA 79300 U

Корисна модель належить до галузей біології та медицини і може бути використана для прогнозування тяжкого та ускладненого перебігу atopічного дерматиту у дітей.

Атопічний дерматит (АД) на сьогодні залишається важливою і складною медико-соціальною проблемою, яка зумовлена його розповсюдженістю, збільшенням переходу захворювання в тяжкі і хронічні форми. Тяжкість проблеми АД також зумовлена початком "алергічного маршу", коли захворювання прогресує від шкірних до респіраторних проявів алергії: алергічного риніту (АР), бронхіальної астми (БА), формування якої часто спричинює підвищена сприйнятливість до вірусних інфекцій. АД розглядають як мультифакторіальне захворювання, виникнення якого значною мірою пов'язане зі спадковою схильністю. Гени схильності до atopічних захворювань містять поліморфізми, які обумовлені відхиленням послідовності структурних компонентів генів, що є причиною зміни їх функцій. Проведення геномних досліджень дозволяє ідентифікувати ділянки геному, з якими асоціюється розвиток АД. Гени можуть спричинювати розвиток atopії в цілому або впливати на специфічну IgE-відповідь на алергени, вираженість алергічного запалення, а також бути пов'язаними з іншими ланками алергічного процесу [Балаболкин И.И., Тюменцев Е.С. Влияние генетических факторов на развитие атопического дерматита у детей / Педиатрия. - 2009. - Т. 87, № 2. - С. 125-129].

Відомо ряд способів визначення генетичної детермінованості при АД: визначена роль поліморфізму гена інтерлейкіну-12b1 у розвитку АД [Association of the IL12RB1 promoter polymorphisms with increased risk of atopic dermatitis and other allergic phenotypes / N. Takahashi, M. Akahoshi, A. Matsuda [et al.] // Human Molecular Genetics. - 2005. - V. 14, № 21. - P. 3149-3159]. Встановлений зв'язок поліморфізму інтерлейкіну-10 з АД у корейських дітей [Association of interleukin-10 gene promoter polymorphism in children with atopic dermatitis / N. Takahashi, M. Akahoshi, A. Matsuda / M.H. Sohn, J.S. Song, K.W. Kim [et al.] // J Pediatr. - 2007. - V. 150, № 1. - P. 106-108]. Відомо про роль порушень бар'єрної функції шкіри при АД спричинених мутаціями в гені, що кодує філаггрін [Мутации в гене филаггрина как предрасполагающий фактор развития атопического дерматита / Т.И. Саликова, В.Н. Максимов, Ю.В. Максимова [и др.] // Клиническая дерматология и венерология. - 2010. - № 3, С. 4-7; Денисов А.А. Закономерности иммунологической и структурной перестройки кожи при атопическом дерматите: автореф. на соискание уч. степени канд. мед. наук: спец. 14.03.09 "Клиническая иммунология, аллергология", 03.03.04 "Клеточная биология, цитология, гистология" / А.А. Денисов. - Новосибирск., 2011. - 36 с.]. Виявлені асоціації тяжкого АД з деякими антигенами HLA та їх комбінаціями [Иллек Я.Ю. Ассоциации HLA-антигенов при тяжелом течении атопического дерматита у детей раннего возраста / Я.Ю. Иллек, Г.А. Зайцева, А.В. Галанина // Педиатрия. - 2008. - Т. 87, № 4, с. 18-20]. Доказана роль поліморфізму 2258G/A гена TLR2 у хворих на АД з тяжким перебігом захворювання, підвищеним рівнем IgE та більшою сприйнятливістю до колонізації золотистим стафілококом [The toll-like receptor 2 R753Q polymorphism defines a subgroup of patients with atopic dermatitis having severe phenotype / P. Ahmad-Nejad, S. Mrabet-Dahbi, K. Breuer [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol.-2004. - V. 113, № 3. - p. 565-567]. Є дані про зв'язок поліморфізму гену TLR2 (rs4696480) з тяжким перебігом АД в дорослих [Association of the toll-like receptor 2 A-16934T promoter polymorphism with severe atopic dermatitis / D.-Y. Oh, R. R. Schumann, L. Hamann [et al.] // Allergy.-2009. - V. 64, № 11. - P. 1608 1615]. Також, показана асоціація поліморфізму C-1237T гена TLR9 з АД [Putative association of a TLR9 promoter polymorphism with atopic eczema / N. Novak, C-F. Yu, C. Bussmann [et al.] // Allergy. 2007. - V. 62, № 7. P. 766-772].

Найбільш близьким аналогом до заявленого способу є спосіб дослідження алельних поліморфізмів генів цитокинів TNFA, IL4, IL5 і HLA-DRB1, -DQA1, -DQB1 при різних варіантах клінічного перебігу АД (Карпова А.В. Сочетанный анализ аллельного полиморфизма генов цитокинов TNFA, IL4, IL5 и HLA-DRB1, -DQA1, -DQB1 при различных вариантах клинического течения атопического дерматита.: автореф. на соискание уч. степени канд. мед. наук: спец. 14.00.36 "Аллергология и иммунология", 14.00.11 "Кожные и венерические болезни" / А.В. Карпова. - Новосибирск., 2009.-22 с.). В основу цього способу поставлено задачу оцінити інформативність сполученого виявлення алелей генів цитокинів IL4, IL5, TNFA і HLA-комплексу для прогнозу розвитку різних варіантів перебігу АД. Методика ґрунтується на генотипуванні алельних варіантів генів методом рестриктного аналізу продуктів ампліфікації (ПДРФ - аналіз) і методом алель-специфічної ампліфікації зі сиквенс-специфічними праймерами (PCR-mSSP), та виявленні асоційованості алельних варіантів для прогнозування варіанту перебігу АД на ранніх етапах виникнення захворювання.

Проте, для практичної медицини, даний спосіб має ряд недоліків, які обумовлені складністю та громіздкістю проведення обстежень, що вимагає значних фінансових затрат на дослідження "генетичних ансамблів", відсутністю чітких критеріїв для призначення подібної методики. Крім

того, спосіб прогнозу розвитку різних варіантів перебігу АД за рахунок виявлення поліморфізму генів цитокінів, застосовувався лише щодо дорослих осіб. Відомості про інформативність даного методу серед дитячого населення відсутні, що вносить протиріччя в доцільність застосування подібного обстеження.

5 В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб прогнозування тяжкого та ускладненого перебігу захворювання в дітей хворих на АД зі схильністю до гострих респіраторних вірусних інфекцій з урахуванням генотипу.

10 Поставлена задача вирішується шляхом створення способу визначення генетичної детермінованості при atopічному дерматиті шляхом ідентифікації ділянок геному, з якими асоціюється розвиток та перебіг захворювання, згідно з корисною моделлю, для підвищення ефективності визначення ризику тяжкого та ускладненого перебігу atopічного дерматиту у дітей зі схильністю до частих гострих респіраторних вірусних інфекцій, як генетичні маркери використовують аналіз поліморфних ділянок 896A/G гену TLR4 (rs4986790) методом ПЛР на наявність мутантної алелі 896 G.

15 Запропонований спосіб дозволяє прогнозувати тяжкий перебіг та подальший розвиток "атопічного маршу" в дітей хворих на АД зі схильністю до частих гострих респіраторних вірусних інфекцій з урахуванням генетичних маркерів ризику розвитку патології.

20 Заявлений спосіб вирішується наступним чином: після проведеного детального збору анкетних даних, анамнезу, даних клінічного стану на час огляду, об'єктивних даних зі сторони різних органів та систем та алергологічного обстеження була сформована група хворих на АД, до якої ввійшли 27 дітей з АД зі схильністю до частих ГРВІ (діти віком від 1 до 3 років з кратністю ГРВІ - 6 і більше разів на рік, діти від 3 до 5 років - 5 і більше разів на рік, діти старші за 5 років - 4 і більше разів на рік), які перебували на диспансерному обліку в дитячих поліклінічних відділеннях дитячих міських клінічних лікарень м. Полтави. Діагноз АД 25 установлювали на основі діагностичного алгоритму, що прийнятий в Україні та затверджений МОЗ України на основі критеріїв діагностики Hanifin, Rajka (1980). Групу контролю склали 81 практично здорові особи з бази ДНК НДІ генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики ВДНЗУ "Українська медична стоматологічна академія", які були скриновані на відсутність обтяженого алергологічного анамнезу.

30 Отримання периферичної крові пацієнтів здійснювали шляхом забору крові з кубітальної вени натщесерце в об'ємі 4 мл у вакуумну пробірку з ЕДТА (8,4 мг К3ЕДТА). Виділення геномної ДНК проводили методом фенол-хлороформної екстракції. Визначення поліморфізму 896A/G гену TLR4 проведено методом полімеразної ланцюгової реакції. Ампліфікацію специфічної ділянки ДНК здійснювали на ампліфікаторі "Терцик" ("ДНК-Технологія", м. Москва) з 35 використанням специфічних олігонуклеотидних праймерів: 5'-GATTAGCATACTTAGACTACCTCCATG-3' та 5'-GATCAACTTCTGAAAAAGCATTCSSAC-3' за такою програмою: денатурація 94 °С, 30 сек., 52 °С, 1хв., 72 °С 1 хв., 1 цикл; 30 циклів: 94 °С, 30 сек., 55 °С, 30 сек., 72 °С 30 сек.; заключний цикл - 72 °С 5 хв. Зберігання -10 °С. Для ідентифікації алелей проводили рестрикційний аналіз ампліконів за допомогою ендонуклеази рестрикції Msp I (НВО "Сибензим", Новосибірськ). Продукти рестрикції аналізували за 40 допомогою електрофорезу в 3 % агарозному гелі ("Helikon", Москва) в 1хТВЕ (50 мМ трис-Н₃ВО₃ та 2 мМ ЕДТА, рН 8,0) протягом 2 годин при напрузі 2V на 1 см гелю. Гель фарбували етидіумом бромідом із подальшою візуалізацією результатів в УФ-світлі.

45 Математичну обробку отриманих даних здійснювали з використанням програми "STATISTICA 6.0" (StatSoft Inc). Розподіл генотипів за досліджуваними поліморфними локусами перевіряли на відповідність рівновазі Харді-Вайнберга за допомогою критерію χ^2 . Для порівняння частот алелей використовували критерій χ^2 Пірсона з поправкою Ієтса на безперервність за кількості ступенів свободи рівній 1. Порівняння частот генотипів між досліджуваними групами проводили шляхом аналізу таблиць спряженості за допомогою 50 точного тесту Фішера. Для порівняння частот варіантів у незв'язаних групах вираховували відношення шансів (ВШ) із визначенням 95 % довірчого інтервалу (ДІ). Аналіз відмінності частотних характеристик якісних ознак у двох незалежних групах проводили за допомогою точного двостороннього критерію Фішера (для малих груп). Для усіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

55 Результати аналізу розподілу частот генотипів та алелей гену TLR4 за поліморфізмом 896A/G у групах контролю та обстежених дітей хворих на АД зі схильністю до частих ГРВІ наведено в таблицях 1-3.

Таблиця 1

Розподіл частот генотипів і алелей поліморфізму 896A/G гену TLR4 серед груп контролю і дітей хворих на АД зі схильністю до частих ГРВІ, % (n)

| Ген, поліморфізм | Частота генотипу | Група контролю (n=81) | Група хворих на АД (n=27) | p* |
|------------------|------------------|-----------------------|---------------------------|------|
| TLR4 896A/G | AA | 96,30 (78) | 85,19 (23) | 0,06 |
| | AG | 3,70(3) | 11,11 (3) | |
| | GG | - | 3,70 (1) | |

p* - рівень значимості, отриманий точним тестом Фішера

Таблиця 2

Розподіл частот алелей поліморфізму 896A/G гену TLR4 серед груп контролю і дітей хворих на АД зі схильністю до частих ГРВІ, % (n)

| Частота алелі | Група контролю (n=81) | Група хворих на АД (n=27) | χ^2 Пірсона, df=1 | ВШ (95 % ДІ) | p* |
|---------------|-----------------------|---------------------------|------------------------|----------------------|-------|
| A | 98,1 (159) | 90,7 (49) | 4,33 | 5,06 (1,28-20,08) | 0,038 |
| G | 1,9(3) | 9,3 (5) | | | |

p* - рівень значимості, отриманий тестом χ^2

5 Як видно з таблиці 1, при дослідженні поліморфізму 896A/G гену TLR4 в групі контролю виявлено, що частота "дикого типу" генотипу AA становила 96,3 %, гетерозиготного генотипу AG-3,7 %, мутантний генотип GG - не виявлений. У дітей, хворих на АД зі схильністю до частих ГРВІ, відповідно: AA - 85,19 %, AG-11,11 % та GG-3,7 %, що відповідає теоретично очікуваним при рівновазі Харді-Вайнберга, як у групі контролю ($\chi^2=1,79$), так і в групі хворих ($\chi^2=1,54$) (табл. 3). Тобто, між частотами генотипів у групах контролю та хворих на АД зі схильністю до частих ГРВІ виявлена різниця на рівні статистичної тенденції (p=0,06). Алелі A та G в групі контролю зустрічалися з частотою 98,1 % і 1,9 % відповідно. Достовірно значно вищою виявилася частота мутантної алелі G в групі хворих на АД зі схильністю до частих ГРВІ, яка склала 9,3 %, у порівнянні з групою контролю ($\chi^2=4,33$; ВШ=5,06; ДІ=1,28-20,08; p=0,038) (табл. 2).

15 При внутрішньогруповому аналізі розподілу частот генотипів та алелей досліджуваного поліморфізму спостерігався нерівномірний розподіл алелей, на що вказує проведений аналіз показника врахування рідкісних алелей ($\mu < 2$) і частки рідкісних алелей ($h > 0$), а також виявлено співпадання очікуваної гетерозиготності та гетерозиготності, яка спостерігається, що свідчить про рівновагу генетичної структури даної популяції (табл. 3).

Таблиця 3

Внутрішньогруповий аналіз розподілу частот генотипів та алелей поліморфізму 896A/G гену TLR 4

| | Група контролю (n=81) | Група хворих на АД (n=27) |
|--|-----------------------|---------------------------|
| χ^2 -Пірсона з поправкою Іейтса, df=1 | 1,79 | 1,54 |
| Гетерозиготність, що спостерігається (Hobs) | 0,04 | 0,11 |
| Очікувана гетерозиготність (Hexp) | 0,04 | 0,17 |
| Нормоване відхилення Hobs від Hexp (коефіцієнт інбридингу популяції) (F) | -0,02 | 0,34 |
| Адекватне врахування рідкісних алелей (показник μ) | 1,27 | 1,58 |
| Частка рідкісних алелей (h) | 0,37 | 0,21 |

20

При порівнянні хворих на АД зі схильністю до частих ГРВІ з гетеро- і гомозиготним генотипом (A/G, G/G) за мутантною алеллю та хворими дітьми з гомозиготним генотипом за "диною" алеллю виявлені асоціації мутантної алелі 896G гену TLR4 з тяжким перебігом

захворювання ($p=0,0485$); супутніми аденоїдними вегетаціями у поєднанні з алергічним ринітом ($p=0,0053$); полівалентною алергією на 4 види алергенів ($p=0,0485$) (табл. 4).

Таблиця 4

Порівняння серед групи хворих на АД зі схильністю до частих ГРВІ ($n=27$) залежно від генотипів поліморфізму 896A/G гену TLR4

| Клінічні особливості АД | | 896 A/G гену TLR4 (генотип AG/GG) (n=4) | 896 A/G гену TLR4 (генотип AA) (n=23) | p* |
|--------------------------------|-----|--|--|--------|
| Перебіг АД середньої тяжкості | так | 2 | 20 | 0,1444 |
| | ні | 2 | 3 | |
| Тяжкий перебіг АД | так | 2 | 1 | 0,0485 |
| | ні | 2 | 22 | |
| Супутні АВ | так | 3 | 7 | 0,1282 |
| | ні | 1 | 16 | |
| Супутні АВ+АР та/або БА | так | 3 | 3 | 0,0248 |
| | ні | 1 | 20 | |
| Супутні АВ+АР | так | 3 | 1 | 0,0053 |
| | ні | 1 | 22 | |
| Алергія до 3-х видів алергенів | так | 2 | 7 | 0,5815 |
| | ні | 2 | 16 | |
| Алергія до 4-х видів алергенів | так | 2 | 1 | 0,0485 |
| | ні | 2 | 22 | |

p* - рівень значимості, отриманий точним тестом Фішера (двосторонній критерій)

- 5 Позитивний результат від заявленого способу прогнозування перебігу АД у дітей полягає в можливості визначити ризик тяжкого та ускладненого перебігу АД у дітей зі схильністю до частих ГРВІ на підставі визначення генетичних маркерів ризику розвитку патології, а саме наявність мутантної алелі 896G гену TLR4 визначає перебіг захворювання та подальший розвиток "атонічного маршу" у дітей хворих на АД.

10

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

15

Спосіб прогнозування перебігу atopічного дерматиту у дітей шляхом ідентифікації ділянок геному, з якими асоціюється розвиток та перебіг захворювання, який **відрізняється** тим, що для підвищення ефективності визначення ризику тяжкого та ускладненого перебігу atopічного дерматиту у дітей зі схильністю до частих гострих респіраторних вірусних інфекцій як генетичні маркери використовують аналіз поліморфних ділянок 896A/G гена TLR4 (rs4986790) методом полімеразної ланцюгової реакції на наявність мутантної алелі 896G.

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

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