



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **85434** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
A61B 5/00
G01N 1/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2013 03297</p> <p>(22) Дата подання заявки: 18.03.2013</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.11.2013</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.11.2013, Бюл.№ 22</p>	<p>(72) Винахідник(и): Кайдашев Ігор Петрович (UA), Шликова Оксана Анатоліївна (UA), Весніна Людмила Едуардівна (UA), Аветиков Давид Соломонович (UA), Скрипник Володимир Михайлович (UA), Воровський Олег Олегович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД УКРАЇНИ "УКРАЇНЬСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ", вул. Шевченка, 23, м. Полтава, 36011 (UA)</p>
--	---

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ g28197A>G ГЕНА ЕЛАСТИНУ МЕТОДОМ АЛЕЛЬ-СПЕЦИФІЧНОЇ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

(57) Реферат:

Спосіб визначення однонуклеотидного поліморфізму g28197A>G гена еластину методом алель-специфічної полімеразної ланцюгової реакції включає визначення наявності поліморфних алелей А та G. Одночасно виявляється наявність "дикої" та мутантної алелі за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з парою алель-специфічних праймерів та парою специфічних проб, мічених флуоресцентними барвниками FAM і R6G з 5'-кінця і BHQ-1, BHQ-2 з 3'-кінця, відповідно. Детекція продуктів реакції проводиться в режимі реального часу.

UA 85434 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до медичної діагностики, і може бути використана для визначення однонуклеотидного поліморфізму g28197A>G в 20 екзоні гена еластину (ELN) з метою ранньої діагностики та профілактики захворювань, що пов'язані з патологією структур екстрацелюлярного матриксу, а також для отримання точного, об'єктивного прогнозу розвитку захворювань, викликаних даною патологією.

Дослідження останніх десятиріч показали, що в результаті порушення, внутрішньогенних делецій або точкових мутацій в гені еластина розвиваються такі захворювання як суправальвулярний аортальний стеноз (SVAS), субарахноїдальні аневризми (Curran M.E. The elastin gene is disrupted by a translocation causing supraaortic stenosis/M.E. Curran, D.L. Atkinson, A.K. Ewart et al. // Cell.-1993. - Vol. 73. P. 159-168; Ruigrok Y.M. Association of polymorphisms and haplotypes in the elastin gene in Dutch patients with sporadic aneurysmal subarachnoid hemorrhage / Y.M. Ruigrok, U. Seitz, S. Wolterink et al. // Stroke.-2004. - Vol. 35. - P. 2064-2068). Показано, що мутації в гені еластина можуть відповідати за порушення пружності в системі еластичних волокон шкіри (Graul-Neumann L.M. Highly variable cutis laxa resulting from a dominant splicing mutation of the elastin gene/ L.M. Graul-Neumann, I. Hausser, M. Essayie, A. Rauch, C Kraus // Am. J. Med. Genet. A.-2008. - Vol/146A(8). - P. 977-983).

Традиційно визначення поліморфізмів генів базується на використанні методу полімеразної ланцюгової реакції з наступним рестрикційним аналізом (ПЛР-ПДРФ), 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, досить складні, трудомісткі, вимагають багато часу.

До аналогів способу, що заявляється, можна віднести метод визначення поліморфізму S422G гена еластину, суть якого полягає в визначенні наявності мутантної алелі методом ПЛР-техніки радіоактивного мічення (Hanon O. Aging, carotid artery distensibility, and the Ser422Gly elastin gene polymorphism in humans / O. Hanon, Vu Luong, J.J. Mourad et al. // Hypertension.-2001. - Vol. 38. - P. 1185-1189). Однак, недоліками даного методу є багатостадійність та трудомісткість процесу аналізу, використання радіоактивних компонентів, що потребує особливого технічного обладнання. Тому, направленість досліджень повинна бути спрямована на пошук та розробку точних, сучасних та не трудомістких, надійних методів виявлення однонуклеотидних поліморфізмів, що можуть бути пов'язані з патологією екстрацелюлярного матриксу.

Найбільш близьким до запропонованого способу є метод (Rodrigues C.J. Elastin (ELN) gene point mutation in patients with inguinal hernia / Consuelo Junqueira Rodrigues, Jin Hwan Yoo and Aldo Junqueira Rodrigues Junior // Genetics and Molecular Biology.-2006. - Vol. 29, N. 1. - P. 45-46). Суть якого полягає у пошуку точкової мутації g28197A>G гена еластину шляхом оцінки конформаційного поліморфізму одноланцюгових фрагментів ДНК, що складається з ампліфікації гена методом ПЛР та визначається за допомогою денатурації отриманого фрагменту та його електрофорезу. Цей метод дозволяє проводити аналіз значної кількості проб, що відповідають декільком ексонам великого гена або отриманих від великої кількості хворих.

Недоліками даного методу є, перш за все, висока вартість реактивів та обладнання, що використовується, даний підхід найбільш придатний для аналізу відносно коротких (200-300 п.н.) фрагментів ДНК, складність в інтерпретації отриманих результатів, що не дає можливості широкого використання його для виявлення однонуклеотидного поліморфізму g28197A>G гена еластину в повсякденній клінічній практиці.

В основу корисної моделі поставлена задача створення способу визначення однонуклеотидного поліморфізму g28197A>G гена еластину, що дозволяє визначити генетичні детермінанти розвитку структурних змін компонентів екстрацелюлярного матриксу, а саме еластину, з метою ранньої діагностики патологічних змін сполучної тканини, формування прогнозу, визначення показань для окремих препаратів і вибору правильної лікувальної тактики.

Поставлена задача вирішують створенням способу визначення однонуклеотидного поліморфізму g28197A>G гена еластину методом алель-специфічної полімеразної ланцюгової реакції, який включає визначення наявності поліморфних алелей А та G, відрізняється від відомого тим, що одночасно виявляється наявність "дикої" та мутантної алелі за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з парою алель-специфічних праймерів та парою специфічних проб, мічених флуоресцентними барвниками FAM і R6G з 5'- кінця і BHQ-1, BHQ-2 з 3'-кінця, відповідно, а детекція продуктів реакції проводиться в режимі реального часу.

Спосіб реалізується таким чином: проводять виділення геномної ДНК з венозної крові обстежуваних за допомогою набору "ДНК-експрес-кров" (ООО НПФ "Литех", Росія).

Мутантний та "дикий" тип алелей гена ELN ампліфікують за допомогою алель-специфічної ПЛР в 25 мкл реакційної суміші, що містить: суміш дезоксинуклеозидтрифосфатів 2,5 тМ кожного, 10 х ПЛР-буфер, 25 тМ MgCl₂, 5 Е/мкл Tag-ДНК полімерази з антитілами, що інгібують активність фермента (Компанія СИНТОЛ, Росія) та по 5 пкмоль специфічних праймерів:
 5 ELN_up 5'-GGA GTC GGA GGT ATC CCT GG -3'; ELN_low 5'-TGA CTA AGG CTC ACG GGA AAT G-3', по 5 пкмоль специфічних проб мічених флуоресцентними барвниками FAM і R6G з 5'- кінця і ВНQ-1, ВНQ-2 з 3'-кінця, відповідно: ELN_wt (FAM) TG TCC CTG GTG TCG GAG-(ВНQ-1); ELN_m2 (R6G) TG TCC CTA GTG TCG GAG-(ВНQ-2) (Компанія СИНТОЛ, Росія).

Геному ДНК обстежуваних додають до суміші кількістю 20-50 нг. Ампліфікацію поліморфної ділянки гена ELN проводять на детектувальному ампліфікаторі ДТ-322 (ООО "НПО ДНК-Технологія", Росія) в режимі реального часу, наступним чином: початок ампліфікації при 95 °С - 2 хвилини, накопичення ампліфікаційного продукту протягом 40 циклів, 95 °С - 20 секунд, 63 °С - 40 секунд.

Приклад практичного використання способу.

15 Проведено вивчення зв'язку наявності поліморфізму g28197A>G гена еластину з процесом патологічного рубцювання ран у 38 хворих, що знаходилися на стаціонарному і амбулаторному лікуванні після планових хірургічних втручань з приводу різних захворювань, первинної хірургічної обробки ран у різних топографо-анатомічних ділянках голови та шиї. За анамнестичними даними та клінічними спостереженнями за процесом рубцювання ран хворі
 20 були розподілені на групи: хворі з наявністю патологічних рубців (основна група ((n=18)), та хворі, що не мають патологічних рубців (група порівняння (n=20)).

Наявність "дикого типу" генотипу AA спостерігали у 33,3 % хворих основної групи, частота гетерозиготного генотипу AG складала 38,9 %, а гомозиготний генотип за мутантною алеллю GG зустрічався у 27,8 % хворих даної групи. Частоти алелей А і G склали 52,8 % та 47,2 %, відповідно, а носіями алелей (співвідношення кількості осіб з даним алелем до загальної кількості осіб в групі) А і G були 72,2 % та 61,1 % осіб, відповідно.

25 Частота гомозиготного генотипу AA гена ELN в групі порівняння складала 65 %, гетерозиготний генотип AG зустрічався з частотою 30 %, частота мутантного генотипу GG-5,0 %. Алель А зустрічалась у 80,0 %, а алель G у 20,0 % хворих даної групи. Носійство А алелі
 30 визначено в 81,5 % осіб, а G алелі - у 65,8 %.

При порівнянні частот алелей А та G між групами хворих, що досліджувались, виявлено достовірну залежність між наявністю поліморфної алелі G та підвищеним ризиком утворення патологічних рубців (ВШ = 3,58, ДІ (95 %)= 1,3-9,87, p=0,023).

35 Наявність точкової мутації g28197A>G гена еластину було досліджено в групі пацієнтів з грижозносіємством (основна група (n=55)) та у осіб без грижової хвороби (контрольна група (n=32)). Показано, що із 55 хворих основної групи дана мутація зустрічалась у 13 хворих (23,6 %), із них рецидив захворювання мав місце у 6 (46,2 %) випадках, де 4 (7,3 %) були гомозиготи (GG), а 9 (16,4 %) - гетерозиготи (AG). В той же час в контрольній групі точкова мутація спостерігалась в 3 (9,4 %) випадках, де 1 (3,1 %) - гомозигота (GG), а 2 (6,3 %) - гетерозиготи (AG). Таким чином, отримано достовірну різницю (p<0,05) частоти даної мутації між основною
 40 групою, куди увійшли хворі з різною локалізацією гриж, та контрольною групою, де грижова патологія була відсутня. Спостерігався високий відсоток (46,2 %) пацієнтів в даній групі з рецидивним перебігом хвороби.

45 Таким чином, за допомогою способу, що заявляється, доцільно визначати наявність мутантної алелі поліморфізму g28197A>G гена еластину.

Визначення однонуклеотидного поліморфізму g28197A>G гена еластину, за допомогою даного способу, є зручним у використанні, інформативним, високоспецифічним, дозволить забезпечити об'єктивне, надійне та точне визначення даного поліморфізму, що допоможе точніше прогнозувати та контролювати перебіг захворювань, які пов'язані з патологією структур
 50 екстрацелюлярного матриксу.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

55 Спосіб визначення однонуклеотидного поліморфізму g28197A>G гена еластину методом алель-специфічної полімеразної ланцюгової реакції, що включає визначення наявності поліморфних алелей А та G, який **відрізняється** тим, що одночасно виявляється наявність "дикої" та мутантної алелі за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з парою алель-специфічних праймерів та парою специфічних проб, мічених флуоресцентними барвниками FAM і R6G з 5'-кінця і ВНQ-1, ВНQ-2 з 3'-кінця, відповідно, а детекція продуктів реакції проводиться в режимі
 60 реального часу.

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

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