View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk

brought to you by CORE

provided by Electronic Sumy State University Institutional Repository

УКРАЇНА

(19) UA (11) 138681 (13) U

(51) МПК

G01N 33/48 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2019 04863**

(22) Дата подання заявки: **07.05.2019**

(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **10.12.2019**

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.12.2019, Бюл.№ 23**

(72) Винахідник(и):
Гарбузова Вікторія Юріївна (UA),
Савченко Інна Миколаївна (UA),
Атаман Олександр Васильович (UA),
Обухова Ольга Анатоліївна (UA),
Похмура Владислав Валерійович (UA)

(73) Власник(и):
СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ,
вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, 40007 (UA)

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ЙМОВІРНОСТІ РОЗВИТКУ ЛЕЙОМІОМИ МАТКИ З УРАХУВАННЯМ 1G/2G-1607-ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА МАТРИКСНОЇ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗИ-1 (MMP-1)

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування ймовірності розвитку лейоміоми матки з урахуванням 1G/2G-1607-поліморфізму гена матриксної металопротеїнази-1 (ММР-1) включає виділення геномної ДНК з лейкоцитів периферійної венозної крові пацієнток з наступним виявленням даних про наявність поліморфізму 1G/2G-1607 гена ММР-1. Після визначення генотипу пацієнтки за поліморфізмом 1G/2G-1607 гена ММР-1 і встановлення генотипу гомозигот за 2G-алелем (2G/2G), враховують наявність факторів: настання менархе до 15 років, артеріальна гіпертензія, цукровий діабет, після чого прогнозують підвищений ризик доброякісного пухлинного процесу в міометрії матки.

UA 138681 U

Корисна модель належить до галузі клінічної та теоретичної медицини, а саме патофізіології, гінекології та медичної генетики, та може бути використана при профілактиці та ранньому виявленні розвитку лейоміоми матки.

Лейоміома матки (ЛМ) доброякісне пухлинне утворення, що розвивається з гладеньких м'язових клітинах органа. Є однією з найпоширеніших хвороб жінок і посідає перше місце серед гінекологічних захворювань. За даними проекту глобального дослідження стану здоров'я людей, 171 млн. жінок у світі мають цю недугу [1]. В економічно розвинених країнах від 20 % до 80 % жінок віком до 50 років є носіями міоми матки [2-4], а в країнах пострадянського простору частота цієї пухлини складає 12-25 % від усіх гінекологічних хвороб і досягає максимуму в пізньому репродуктивному і пременопаузальному віці [5-7]. При цьому викликає тривогу те, що останніми роками кількість хворих на лейоміому матки зростає у жінок раннього репродуктивного віку.

З приводу міоми матки виконують до 50-70 % оперативних втручань у гінекологічних стаціонарах, з них переважна більшість припадає на радикальні операції. Соціальна значимість даної проблеми поглиблюється тим, що четверта частина таких операцій проводиться у жінок репродуктивного віку, які ще не встигли реалізувати свою дітородну функцію [8].

Лікарі та дослідники сходяться на думці про мультифакторіальність даної хвороби, тобто визнання ролі широкого ряду не тільки зовнішніх чинників, а й спадкової (генетичної) схильності, що вкладається в патофізіологічну концепцію факторів ризику хвороби.

Вагомі здобутки сучасної медично-біологічної науки дають нині можливість вивчати роль генетичних факторів у виникненні і розвитку хвороб на якісно новому, поглибленому рівні. Це стосується і лейоміоми матки. Значення таких досліджень важко переоцінити, оскільки вони важливі як для раннього виявлення пухлини в групах ризику, так і для ефективного добору лікувальних засобів з урахуванням генетичних особливостей організму.

Нині відомо, що залучення структур тканин до формування пухлин різного походження тісно пов'язано з функціонуванням ферментів матриксних металопротеїназ, що здійснюють гідролітичне розщеплення компонентів сполучної тканини [9, 10]. Результати численних досліджень показали, що поліморфізм генів, які кодують структуру ферментів, має зв'язок зі спадковою схильністю до цілого ряду недуг і патологічних процесів, у тому числі злоякісних і доброякісних новоутворень [11-15]. Що стосується лейоміоми матки, то таких робіт обмаль [16, 17].

Найбільш близьким аналогом є спосіб прогнозування ризику виникнення лейоміоми матки у жінок, що включає виділення геномної ДНК з лейкоцитів периферійної венозної крові пацієнток з наступним виявленням даних про наявність поліморфізму 1G/2G-1607 гена ММР-1 та його урахуванням при прогнозуванні розвитку лейоміоми матки [18].

Недоліком найближчого аналога є недостатня ефективність прогнозування розвитку лейоміоми матки, оскільки не були враховані такі фактори ризику розвитку як артеріальна гіпертензія, стрес, цукровий діабет тощо

В основу корисної моделі поставлено задачу спрощення методики та підвищення якості прогнозування розвитку лейоміоми матки; скорочення тривалості періоду прогнозування та раннього виявлення; удосконалення методу діагностики лейоміоми матки з метою отримання ефективного, фінансово доцільного та уніфікованого методу прогнозування розвитку ЛМ у популяції з урахуванням поліморфізму гена ММР-1; проведення прогнозування з враховуванням підвищення ризику розвитку ЛМ ігри наявності чи відсутності загальних ендо- і екзогенних факторів ризику: настання менархе до 15 років, артеріальній гіпертензія (АГ), цукровому діабеті (ЦД).

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб прогнозування ймовірності розвитку лейоміоми матки з урахуванням 1G/2G-1607-поліморфізму гена матриксної металопротеїнази-1 (ММР-1), що включає виділення геномної ДПК з лейкоцитів периферійної венозної крові пацієнток з наступним виявленням даних про наявність поліморфізму 1G/2G-1607 гена ММР-1, згідно з корисною моделлю, після визначення генотипу пацієнтки за поліморфізмом 1G/2G-1607 гена ММР-1 і встановлення генотипу гомозигот за 2G-алелем (2G/2G), враховують наявність факторів: настання менархе до 15 років, артеріальна гіпертензія, цукровий діабет, після чого прогнозують підвищений ризик доброякісного пухлинного процесу в міометрії матки.

Запропонований спосіб прогнозування ймовірності розвитку лейоміоми матки з урахуванням 1G/G2-1607-поліморфізму гена матриксної металопротеїнази-1 (ММР-1) дозволяє на основі отриманих об'єктивних даних про наявність асоціації 1G/2G-1607 гена ММР-1 підвищити рівень виявлення на ранніх станах розвитку пухлини, покращити діагностику, що дозволить суттєво знизити ризик розвитку ЛМ. Перевагою даного засобу є висока інформативність, відносна

простота проведення та економічна вигода завдяки тому, що дане дослідження проводиться один раз на життя.

Використання запропонованого способу дозволить суттєво знизити ризик розвитку лейоміоми матки у жінок з групи ризику (артеріальна гіпертензія, цукровий діабет), таким чином вирішуючи поставлену технічну задачу.

Дані про асоціацію 1G/2G-1607 гена MMP-1 з лейоміомою матки можуть бути використані для прогнозування ймовірності розвитку хвороби у пацієнтів, що мають річні загальні і репродуктивно-гінекологічні фактори ризику пухлини. Встановлення осіб, генетично схильних до лейоміоми матки, сприятиме профілактиці і ранньому виявленню хвороби, що матиме значний соціально-економічний ефект.

Спосіб здійснюється наступним чином. Матеріалом для аналізу слугує венозна кров. Після забору біологічного матеріалу проводиться виділення геномної ДНК з використанням комерційного набору "NMOGEN" (Україна) з наступним молекулярно-генетичним дослідженням поліморфних варіантів зазначеного гена.

Визначення поліморфізму 1G/2G-1607 гена MMP-1 (rs 1799750) проводиться за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції (PCR) з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів при виявленні їх шляхом електрофорезу в агарозному гелі (RFLP) у термоциклері GeneAmp PCR System 2700 ("Applied Biosystems", США). Ампліфікація ділянки гена, що містить сайт 1G/2G-1607 поліморфізму в промоторі гена MMP1, проводиться за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (sence) 5'-TGACTTTTAAAACATAGTCTATGTTCA-3′ і зворотного (antisense) 5'-TCTTGGATTGATTTGAGATAAGTCATAGA-3'. Для ампліфікації беруть 50-100 нг ДНК і додають до суміші, що містить 5 мкл 5-кратного PCR - буферу, 1,5 мМ сульфату магнію, 250 мкМ суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 15 рМ кожного з праймерів і 1,0 ОД Taq - полімерази, об'єм доводять до 25 мкл деіонізованою водою. Ампліфікація фрагмента гена складається з 30 циклів: денатурація 94 °С (50 с), гібридизація праймерів - 62,5 °С (45 с) і елонгація 72 °С (1 хв). Для рестрикційного аналізу 6 мкл продукту ампліфікації інкубують при 37 °С упродовж 18 годин з 3 ОД рестриктази AluI у буфері Tango такого складу: 3,3 мМ трис-ацетату (рН 7,9), 10 мМ ацетату магнію, 66 мМ ацетату калію, 0,1 мг/мл альбуміну. Ампліфікати одержаного фрагмента гена MMP1 після рестрикції розділяють в 2,5 % агарозному гелі, що містить бромистий етидій, горизонтальний електрофорез (0,1А; 14ОV) проводять протягом 35 хв. Візуалізацію фрагментів ДНК після електрофорезу здійснюють за допомогою трансілюмінатора ("Біоком", Росія).

Аналіз результатів: якщо в - 1607-й позиції гена MMP1 не містився додатково один гуанін (1G-1607), то ампліфікат, що складався з 269 пар основ, розщеплювався рестриктазою AluI на два фрагменти 241 і 28 пар основ. У разі присутності додаткового гуаніну (2G-1607), сайт рестрикції для AluI втрачався і візуалізувався тільки один фрагмент завдовжки 269 пар основ.

Після визначення генотипу жінок і повного анамнезу, який характеризує наявність факторів, що можуть мати стосунок до виникнення і розвитку доброякісних пухлин матки можна прогнозувати ризик розвитку даного захворювання.

За допомогою запропонованого способу проведено обстеження 108 хворих з лейоміомою матки та 84 особи без цієї недуги, що склали контрольну групу.

Статистичний аналіз проводили з використанням програми SPSS-17. Перевірку різниці розподілу генотипів здійснювали за допомогою χ^2-критерію Пірсона. Визначаємо показник Р, який відображає статистичну значимість відмінностей між основною і контрольною групами. Значення $P<0,05$ вважали статистично достовірними. Для прогнозування ризику виникнення лейоміоми у носіїв 2G-алеля використовували метод логістичної регресії ($P<0,05$ статистична значущість).

Завдяки проведеному генотипуванню хворих з лейоміомою та осіб контрольної групи за 1G/2G-1607-поліморфізмом гена MMP-1 були отримані результати, що наведені в таблиці.

Таблиця

Частота алелів та алельних варіантів за 1G/2G-1607 поліморфізмом гена MMP-1 у контрольній групі і у хворих з лейоміомою матки (ЛМ)

	Контрольна група, n (%)	Хворі з ЛМ n (%)
1G-алель	0,44	0,32
2G-алель	0,56	0,68
χ^2=5,416, P=0,0199		
Гомозиготи 1G/1G	15 (17,8)	9 (8,3)

Продовження таблиці

Гетерозиготи 1G/2G	44 (52,4)	51 (47,2)
Гомозиготи 2G/2G	25 (29,8)	48 (44,5)
Разом	84 (100)	108 (100)
χ^2=6,362, P=0,042		
P'	>0,05	>0,05

Примітка: n - кількість пацієнтів, P відображає статистичну значимість відмінностей між основною і контрольною групами, P' - відхилення у кожній групі від рівноваги Харді-Вайнберга.

Проведені дослідження показали, що при виявленні алельного поліморфізму 1G/2G-1607 гена ММР-1 ризик доброякісного пухлинного процесу в міометрії у гомозигот за 2G-алелем у 3,2 рази вищий, ніж у гомозигот за алелем 1G (P=0,017). У жінок, що мають стійкий підвищений тиск, наявність генотипу 2G/2G збільшує ризик лейоміоми в 6,3 разу, якщо порівнювати з носіями генотипу 1G/1G (P=0,026). У жінок, у яких перша менструація настала до 15 років, носійство 2G-алеля істотно збільшує ризик лейоміоми, якщо порівнювати з гомозиготами за основним алелем 1G (у гетерозигот - у 4,9 разу, у гомозигот за 2G-алелем - у 6,9 разу). Водночас такий зв'язок встановлено у жінок, що не хворіють на цукровий діабет. У них, на відміну від діабетиків, відмінності між частотою генотипів за вивченим SNP в основній і контрольній групі були статистично вірогідними (P=0,049). У хворих на ЛМ частота гомозигот 1G/1G виявилася меншою, а гомозигот 2G/2G, навпаки, більшою, ніж у жінок контрольної групи. Аналіз розподілу генотипів за поліморфізмом 1G/2G-1607 у жінок з нормальним і підвищеним артеріальним тиском дозволив виявити асоціацію між досліджуваним генетичним фактором і розвитком ЛМ тільки у пацієнток, що мали артеріальну гіпертензію (АГ). Так, у хворих з ЛМ та АГ співвідношення між генотипами 1G/1G, 1G/2G і 2G/2G становило 4,4 %, 42,2 % і 53,3 %, а у жінок контрольної групи, що мали підвищений тиск - 17,7 %, 48,4 % і 33,9 % (P=0,042). У перших частота гомозигот за основним алелем виявилася меншою, а гомозигот за алелем 2G більшою, ніж у контролі.

Отримані дані дозволяють вирішити поставлену задачу та виявити пацієнтів, що мають генетичну схильність до розвитку лейоміоми матки, проводити ранню діагностику та сформувати групу ризику ЛМ. Рекомендації таким особам повинні включати контроль різних факторів ризику (вчасне лікування АГ, уникання стресових ситуацій, лікування ЦД), що суттєво знизить ризик розвитку лейоміоми матки.

Джерела інформації:

1. Murray C.J., Ortblad K.Г., Guinovart C. at al. Global, regional, and national incidence and mortality for HIV, tuberculosis, and malaria during 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 // Lancet. - 2014. - V. 384, No. 9947. - P. 1005-1070.

2. Alcksandrovych V., Bcreza T., Sajewicz M., Walocha J.A., Gil K. Uterine fibroid: common features of widespread tumor (Review article) // Folia Med. Cracov.- 2015. - V.55, No. 1. P.: 61-75.

3. Laughlin S.K., Schroeder J.C., Baird D.D. New directions in the epidemiology of uterine fibroids // Semin. Reprod. Med. - 2010. - V. 28, No. 3. - P. 204-21 7.

4. Wise L.A., Laughlin-Tommaso S.K. Epidemiology of Uterine Fibroids: From Mcnarche to Menopause // Clin. Obstct. Gynecol. 2016. V. 59, No. 1. - P. 2-24.

5. Буяпова С. Н., Мгелиашвили М. В., Петракова С. Л. Современные представления об этиологии, патогенезе и морфогенезе миомы матки //Российский вестник акушера-гинеколога. - 2008. - Т. 8. - С. 45-51.

6. Вихляева Е.М. Руководство по диагностике и лечению лейомиомы матки. - М: МЕДпресс-информ 2004; 400.

7. Сидорова И.С. Миома матки (современные аспекты этиологии, патогенеза, классификации и профилактики). В кн.: Миома матки. Под ред. И.С. Сидоровой. М: МИА 2003; 5-66.

8. Самойлова Т.Е. Неоперативные методы лечения миомы матки // Лечащий врач. - 2010. - № 3. - http://www.lvrach.ru/2010/03/12355180

9. Ниа Н., Li M., Luo T., Yin Y., Jiang Y. Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm // Cell. Moї. Life Sci. - 2011. V. 68, No. 23. - P.: 3853-368.

10. Kessenbrock K., Plaks V., Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment // Cell. - 2010. - V. 141, No. 1. - P.: 52-67.

11. Chen X., Yu Z., Gao Y., Liu G., Tian L., Li G. Meta-analysis of association between MMP-1-1607 polymorphism and head and neck cancer risk in asia population // Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi. - 2014. - V. 28, No. 21. - P.: 1679-1684.

12. Dedong H., Bin Z., Peisheng S., Hongwei X., Qinghui Y. The contribution of the genetic variations of the matrix metalloproteinasc-1 gene to the genetic susceptibility of gastric cancer // Genet. Test Moï. Biomarkers. - 2014. - V. 18, No. 10. - P.: 675-682.

13. Kang S., Wang Y., Zhang J.H., Jin X., Fang S.M., Li Y. Single nucleotidc polymorphism in the matrix metalloproteinases promoter is associated with susceptibility to endometriosis and adenomyosis // Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 2005. V. 40, No. 9. P.: 601-604.

14. Wang L., Kong B. Analysis of the Association of Matrix Metalloproteinasc-1 Gene Promoter (rs1799750) Polymorphism and Risk oi Ovarian Cancer // Int. J. Gynecol. Cancer. - 2015. - V. 25, No. 6. - P.: 961-967.

15. Zhou P., Du L.F., Lv G.Q., Yu X.M., (hi Y.L., Li J.P., Zhang C Current evidence on the relationship between four polymorphisms in the matrix metalloprotcinases (MMP) gene and breast cancer risk: a meta-analysis // Breast Cancer Res. Treat-2011. - V. 127,No. 3. - P.: 813-818.

16. Takemura N., Yoshida S., Kennedy S., Dcguchi M., Ohara N., Maruo T. Matrix metalloproteinasc-1 and-9 promoter polymorphisms are not associated with an increased risk of uterine leiomyomas in a Japanese population // J. Soc. Gynecol. Investig.-2006-V.I3, No.3. - P.: 232-236.

17. Moravek M.B., Yin P., Ono M., Coon J.S., Dyson M.T., Navarro A., Marsh E.E., Chakravarti D., Kim J.J…Wci J.J. et al. Ovarian steroids, stem cells and uterine leiomyoma: therapeutic implications // Hum. Reprod. Update. 2015. V.21.-P.: 1-12.

18. Morosova E. B., Chukhlovin A. B., Kulagina N. V., Kipich N. V., Totolian A. A. Functional Gene Polymorphism of Matrix Metalloproteinase-1 Is Associated with Benign Hyperplasia of Myo-and Endometrium in the Russian Population // Genetic Testing and Molecular Biomarkers. 2012. Vol. 16, No. 9. - doi.org/10.1089/gtmb.2011.0376.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозування ймовірності розвитку лейоміоми матки з урахуванням 1G/2G-1607-поліморфізму гена матриксної металопротеїнази-1 (ММР-1), що включає виділення геномної ДНК з лейкоцитів периферійної венозної крові пацієнток з наступним виявленням даних про наявність поліморфізму 1G/2G-1607 гена ММР-1, який **відрізняється** тим, що після визначення генотипу пацієнтки за поліморфізмом 1G/2G-1607 гена ММР-1 і встановлення генотипу гомозигот за 2G-алелем (2G/2G), враховують наявність факторів: настання менархе до 15 років, артеріальна гіпертензія, цукровий діабет, після чого прогнозують підвищений ризик доброякісного пухлинного процесу в міометрії матки.

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601