

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2015120486/15, 30.05.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
30.05.2015

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 30.05.2015

(45) Опубликовано: 27.09.2016 Бюл. № 27

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2461830 C1, 20.09.2012; RU 2177729 C2, 10.01.2002; ВОЛКОВИЧ О.В., МОЛДОБАЕВА Н.Т. Прогнозирование выраженности послеоперационного болевого синдрома и его коррекция на основании индекса ноцицепции. Вестник КРСУ. 2008. Том 8. N 4, с. 50-54; СТЕПАНОВА Я. В. и др. Прогнозирование послеоперационной боли на основании психологических характеристик больных (см. прод.)

Адрес для переписки:

308015, обл. Белгородская, г. Белгород, ул.
Победы, 85, ОИС НИУ "БелГУ", Токтарева Т.М.

(72) Автор(ы):

Чурносов Михаил Иванович (RU),
Черкашина Ольга Владимировна (RU),
Демин Сергей Сергеевич (RU),
Полоников Алексей Валерьевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет" (НИУ "БелГУ") (RU)

(54) СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ИНТЕНСИВНОСТИ БОЛЕВОГО СИНДРОМА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ КАЛЬКУЛЕЗНЫМ ХОЛЕЦИСТИТОМ В РАННЕМ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицинской диагностики и касается прогнозирования интенсивности болевого синдрома в раннем послеоперационном периоде у больных хроническим калькулезным холециститом, русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья России. Способ включает забор крови и выделение ДНК из периферической венозной крови. После выделения ДНК проводят анализ полиморфизмов

генов IL-1A -889T>C, IL-5 -703C>T и прогнозируют более выраженную боль у больных хроническим калькулезным холециститом в 18 часов и в 22 часа первых суток после холецистэктомии в случае выявления генотипов -889TT и -889CT IL-1A. Прогнозируют интенсивные болевые ощущения в 8 часов вторых суток после операции при выявлении генотипов -703CT и -703TT IL-5. 5 ил.

(56) (продолжение):

и стандартизованных болевых стимулов. Анестезиология и реаниматология. N 3, 2013, с. 58-63.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 598 880** (13) **C1**

(51) Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2015120486/15, 30.05.2015**

(24) Effective date for property rights:
30.05.2015

Priority:

(22) Date of filing: **30.05.2015**

(45) Date of publication: **27.09.2016** Bull. № 27

Mail address:

**308015, obl. Belgorodskaya, g. Belgorod, ul. Pobedy,
85, OIS NIU "BelGU", Toktareva T.M.**

(72) Inventor(s):

**Churnosov Mikhail Ivanovich (RU),
Cherkashina Olga Vladimirovna (RU),
Demin Sergej Sergeevich (RU),
Polonikov Aleksej Valerevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego nbsp;
obrazovaniya "Belgorodskij gosudarstvennyj
natsionalnyj issledovatel'skij universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**

(54) **METHOD FOR PREDICTION OF INTENSITY OF PAIN SYNDROME IN PATIENTS WITH CHRONIC CALCULOUS CHOLECYSTITIS IN EARLY POSTOPERATIVE PERIOD**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medical diagnostics and concerns prediction of intensity of pain syndrome in early postoperative period in patients with chronic calculous cholecystitis, Russian ethnicity, which are natives of Central black earth region of Russia. Method involves blood sampling and DNA recovery from peripheral venous blood. After DNA is recovered, analysis of polymorphisms of genes IL-1A -889T>C,

IL-5 -703C>T and more evident pain in patients with chronic calculous cholecystitis in 18 and 22 hours of first day after cholecystectomy if observing genotypes -889TT and -889CT IL-1A.

EFFECT: intensive predicted pain sensations in 8 hours of second postoperative day if observing genotypes -703CT and -703TT IL-5.

1 cl, 5 dwg

RU 2 598 880 C 1

RU 2 598 880 C 1

Изобретение относится к области медицинской диагностики, может быть использовано для прогнозирования интенсивности болевого синдрома у больных хроническим калькулезным холециститом в раннем послеоперационном периоде.

Желчнокаменная болезнь (далее ЖКБ) - многофакторное и многостадийное заболевание, характеризующееся нарушением обмена холестерина или билирубина с образованием конкрементов в желчном пузыре или желчных протоках. Заболеваемость ЖКБ в последние десятилетия резко повысилась и продолжает возрастать. ЖКБ занимает 3-е место после сердечно-сосудистых заболеваний и сахарного диабета [Ильченко, А. А. Желчнокаменная болезнь /А. А. Ильченко. - Москва: Анахарсис, 2004. - 200 с.]. Почти 90% всех случаев желчнокаменной болезни составляет хронический калькулезный холецистит (далее ХКХ). У современных жителей Земли желчные камни обнаруживают у 24% женщин и 12% мужчин. По количеству оперативных вмешательств, холецистэктомия занимает второе место после аппендэктомии [Яфаров, А. Р. Применение лазерного излучения на этапах лапароскопической холецистэктомии: дис.... канд. мед. наук: 14.01.17 /А. Р. Яфаров. - Москва, 2010. - 116 с.].

Среди факторов, приводящих к развитию хронического калькулезного холецистита, значимую роль играют генетические факторы. Показана роль отдельных генетических полиморфизмов, участвующих в регуляции воспаления, клеточной пролиферации, метаболизма липидов и желчных кислот в формировании ХКХ [Григорьева, И. Основные факторы риска желчнокаменной болезни /И. Григорьева //Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2007. - Т. 17, №6. - С. 17-21; Lammert, F. Mechanisms of disease: the genetic epidemiology of gallbladder stones /F. Lammert, T. Sauerbruch //Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol. - 2005. - Vol. 2, №9. - P. 423-433]. Среди генов-кандидатов, регулирующих преимущественно процессы воспаления, важное значение имеют интерлейкины. Интерлейкины, взаимодействуя со специфическими рецепторами, являются одними из главных звеньев в воспалительном каскаде при ЖКБ, изменяя интенсивность и длительность воспалительных, склеротических и литогенных процессов в желчном пузыре [Царегородцева, Т. М. Цитокины при заболеваниях органов пищеварения [Электронный ресурс] /Т. М. Царегородцева //Регистр лекарственных средств России: энцикл. лекарств и товаров аптечного ассортимента: офиц. сайт /группа компаний РЛС. - Москва, 2009. - 28 апр. - Режим доступа: http://www.rlsnet.ru/articles_426.htm.].

Провоспалительные интерлейкины, взаимодействуя со своими рецепторами, стимулируют возбуждение в сенсорных нейронах, формируют болевую чувствительность при хирургической агрессии [Dray, A. Inflammatory mediators of pain /A. Dray //Br. J. Anaesth. - 1995. - Vol. 75, №2. - P. 125-131].

Развитию болевого синдрома сопутствует гиперактивация симпатической нервной системы, что приводит к тахикардии, гипертензии, повышению общего периферического сопротивления сосудов. Подобная клиническая картина резко увеличивает вероятность потребности миокарда в кислороде и развития острого инфаркта миокарда у пациентов группы риска. Для профилактики кардиальных осложнений необходимо своевременное лечение выраженной боли и торможение симпатической активности в пред- и послеоперационном периоде [Корячкин, В. А. Анестезия и интенсивная терапия: справ. /В. А. Корячкин, В. И. Страшнов. - Санкт-Петербург: С.-Петербург. мед. изд-во, 2004. - 465 с. - (Б-ка врача анестезиолога)].

IL-1A - белок, кодируемый геном IL-1A, который располагается на второй хромосоме (2q14). IL-1A - провоспалительный цитокин, обладающий широким спектром метаболической, физиологической, кроветворной деятельности, а также играет одну

из центральных ролей в регуляции иммунного ответа. После попадания инфекции в организм, IL-1A активизирует множество процессов системы иммунного ответа. В частности: стимулирует распространение фибробластов, индуцирует синтез протеаз и белков острой фазы, влияет на увеличение числа нейтрофилов крови, активизирует распространение лимфоцитов и вызывает лихорадку [Dinarello, C. A. Induction of interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist /C. A. Dinarello //Semin. Oncol. - 1997. - №24, №3, suppl. 9. - P. S981-S993].

Ген IL-1A содержит 7 экзонов и 6 интронов, на 3 и 5 концах он имеет нетранслируемые области. Кроме того, он обладает высокой степенью гомологии интронных последовательностей, что, возможно, регулирует экспрессию этого гена [Громова, А. Ю. Полиморфизм генов семейства IL-1 человека /А. Ю. Громова, А. С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. - 2005. - Т. 4, №2. - С. 3-12].

IL-5 - димерный белок, массой 50-60 kDa. Ген IL-5 располагается на пятой хромосоме 5q23 -q31. Продуцируется IL-5 Т-клетками (Th 2). В пептидной части одной цепи IL-5 содержатся 115 аминокислотных остатков. Сходной функциональной активностью обладают его мономерная и димерная формы. IL-5 инициирует продукцию иммуноглобулинов и стимулирует синтез IgA [Murphy, J. M. IL-3, IL-5, and GM-CSF signaling: crystal structure of the human beta-common receptor /J. M. Murphy, I. G. Young // Vitam. Horm. - 2006. - Vol. 74. - P. 1-30].

Помимо клеток иммунной системы, данный цитокин оказывает влияние и на миелоидные клетки. IL-5 оказывает избирательное действие на костномозговых предшественников эозинофилов, регулируя их пролиферацию и дифференцировку. Наряду с этим, IL-5 увеличивает продукцию супероксидантов и усиливает хемотаксис данных типов клеток [База знаний по биологии человека /разраб. А. А. Александров. - Москва, 1990-2011. - Режим доступа: <http://humbio.ru>].

Для оценки сложившейся патентной ситуации был выполнен поиск по охраняемым документам за период с 1990 по 2014 гг. Анализ документов производился по направлению: способ прогнозирования интенсивности болевого синдрома у больных хроническим калькулезным холециститом в раннем послеоперационном периоде на основе молекулярно-генетических данных в зависимости от полиморфных маркеров генов интерлейкинов.

Источники информации: сайты Федерального института промышленной собственности <http://fips.ru>.

Известен способ по патенту РФ №2067768 «Способ прогнозирования течения послеоперационного периода у хирургических больных», в котором для повышения точности прогнозирования течения послеоперационного периода в ранние сроки у хирургических больных до операции и в первые 4-5 суток после нее в крови исследуют содержание миоглобина и по результатам 2-3 исследований прогнозируют развитие послеоперационного осложнения. Недостатком данного способа является необходимость неоднократных заборов крови и то, что способ решает задачу прогноза послеоперационных осложнений, а не прогнозирования послеоперационного болевого синдрома после видеолaparоскопической холецистэктомии до проведения операции.

За прототип был выбран патент RU №2461830 «Способ прогнозирования интенсивности и резистентности болевого синдрома после операции видеолaparоскопической холецистэктомии у больных хроническим калькулезным холециститом». Сущность способа заключается в том, что выделяют ДНК из периферической венозной крови, проводят анализ полиморфизма -308 G/A гена фактора некроза опухоли α . При выявлении генотипов -308 AA и -308 AG TNF α прогнозируют

наибольшую выраженность и стойкость болевого синдрома и рекомендуют проведение мультимодальной послеоперационной анальгезии. При выявлении генотипа -308 GG TNF α прогнозируют более слабый болевой синдром и рекомендуют мономодальную послеоперационную анальгезию. Недостаток данного способа заключается в ассоциации с интенсивным болевым синдромом только одного генетического полиморфизма -308 G/A гена фактора некроза опухоли α .

Задачей настоящего изобретения является создание способа прогнозирования интенсивности болевого синдрома в раннем послеоперационном периоде у больных ХКХ.

Технический результат использования изобретения - получение критериев оценки интенсивности болевого синдрома в раннем послеоперационном периоде у больных ХКХ русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья России в зависимости от наличия генетических вариантов полиморфных маркеров IL-1A -889T>C, IL-5 -703C>T, что будет способствовать своевременной профилактике выраженного болевого синдрома у пациентов с ХКХ после видеолaparоскопической холецистэктомии.

В соответствии с поставленной задачей был разработан способ прогнозирования интенсивности болевого синдрома у больных хроническим калькулезным холециститом в раннем послеоперационном периоде, включающий:

- выделение ДНК из периферической венозной крови методом фенольно-хлороформной экстракции;
- генотипирование образцов ДНК с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров;
- прогнозирование более выраженной боли в 18 часов и в 22 часа первых суток после холецистэктомии в случае выявления генотипов -889ТТ и -889СТ IL-1A у больных ХКХ, прогнозирование интенсивных болевых ощущений в 8 часов вторых суток после операции при выявлении генотипов -703СТ и -703ТТ IL-5 у больных ХКХ.

Новизна и изобретательский уровень заключается в том, что из уровня техники не известна возможность прогнозирования интенсивности болевого синдрома у больных хроническим калькулезным холециститом в раннем послеоперационном периоде по наличию генетических вариантов полиморфных маркеров IL-1A -889T>C, IL-5 -703C>T.

Изобретение охарактеризовано на следующих фигурах

На фиг. 1 представлена дискриминация аллелей по локусу IL-1A -889 T>C (rs 1800587), где 2,3,4 - -889ТТ IL-1A; 5,6,10 - -889СС IL-1A; 1, 7-9, 11-14 - -889СТ IL-1A.

На фиг. 2 представлена дискриминация аллелей по локусу IL-5 -703C>T (rs12704795), где 1, 3-8, 12, 15 - гомозиготы -703СС; 10, 11, 13, 14 - гетерозиготы -703СТ; 2, 9 - гомозиготы -703ТТ.

На фиг. 3 представлены ассоциации генетических вариантов локуса IL-1A -889T>C с интенсивностью послеоперационного болевого синдрома у больных ХКХ, время измерения 18 ч.

На фиг. 4 представлена связь генетических вариантов локуса IL-1A -889T>C с уровнем болевых ощущений после холецистэктомии у больных ХКХ, время измерения 22 ч.

На фиг. 5 представлен уровень болевых ощущений после холецистэктомии у больных ХКХ в зависимости от генетических вариантов локуса IL-5 -703C>T, время измерения вторые сутки 8 ч.

Способ осуществляют следующим образом:

Выделение геномной ДНК из периферической крови осуществляют методом

фенольно-хлороформной экстракции в два этапа. На первом этапе к 4 мл крови добавляют 25 мл лизирующего буфера, содержащего 320 мМ сахарозы, 1% тритон X-100, 5 мМ MgCl₂, 10 мМ трис-HCl (pH=7,6). Полученную смесь перемешивают и центрифугируют при 4°C, 4000 об/мин в течение 20 минут. После центрифугирования надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют 4 мл раствора, содержащего 25 мМ ЭДТА (pH=8,0) и 75 мМ NaCl, ресуспензируют. Затем прибавляют 0,4 мл 10% SDS, 35 мкл протеиназы К (10 мг/мл) и инкубируют образец при 37°C в течение 16 часов.

На втором этапе из полученного лизата последовательно проводят экстракцию ДНК равными объемами фенола, фенол-хлороформа (1:1) и хлороформа с центрифугированием при 4000 об/мин в течение 10 минут. После каждого центрифугирования производят отбор водной фазы. ДНК осаждают из раствора двумя объемами охлажденного 96% этанола. Сформированную ДНК растворяют в бидистиллированной, деионизованной воде и хранят при -20⁰С. Выделенную ДНК используют для проведения полимеразной цепной реакции синтеза ДНК.

Анализ всех генетических полиморфизмов интерлейкинов проводят методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК. Для ПЦР используют: ДНК-полимеразу *Thermus aquaticus* производства фирмы «Силекс-М», олигонуклеотидные праймеры и зонды, синтезированные фирмой «Синтол». Полимеразную цепную реакцию выполняют на амплификаторах «Терцик-МС4» (ДНК-технология) и IQ5 (Bio-Rad).

Генотипирование ДНК-маркеров производят методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов с помощью соответствующих эндонуклеаз. Реакция протекала в присутствии буферов и при температурных условиях, рекомендованных производителями эндонуклеаз - ООО «Сибэнзим» (Новосибирск). Продукты рестрикции фракционируют с помощью электрофореза в агарозных гелях различной концентрации и окрашивают в этидиум бромиде (фиг. 1, 2).

Возможность использования предложенного способа для прогнозирования интенсивности болевого синдрома у больных хроническим калькулезным холециститом в раннем послеоперационном периоде подтверждает анализ результатов наблюдений 249 больных хроническим калькулезным холециститом и 294 человек популяционного контроля. Общий объем исследуемой выборки составил 543 человека. Среди больных ХКХ 16,80% составили мужчины (41 человек), 83,20% - женщины (208 человек). В контрольной выборке (n=294) процентное соотношение было аналогичным: мужчины - 17,00% (50 человек), женщины - 83,00% (244 человек) (p>0,05).

В выборки больных и контроля включали индивидуумы русской национальности Центрального Черноземья России, не связанные между собой родственными связями. Пациентов относили к соответствующей группе больных ХКХ после подтверждения установленного диагноза с помощью клинических и лабораторно-инструментальных методов обследования, в соответствии с обязательными диагностическими стандартами. Контрольная группа была сформирована при экспедиционном обследовании населения областей Центрально - Черноземного региона России: Красненского и Прохоровского районов Белгородской области, Репьевского района Воронежской области и Черемисиновского района Курской области.

Типирование молекулярно-генетических маркеров осуществляли в лаборатории «Молекулярной генетики человека» медицинского института Белгородского государственного национального исследовательского университета.

Формирование базы данных и статистические расчеты осуществляли с использованием программы «STATISTICA 6.0».

Характер болевого синдрома определяли при помощи визуально-аналоговых и

цифровых шкал боли [Корячкин, В. А. Анестезия и интенсивная терапия: справ. /В. А. Корячкин, В. И. Страшнов. - Санкт-Петербург: С.-Пб. мед. изд-во, 2004. - 465 с. - (Б-ка врача анестезиолога)]. Для оценки интенсивности болевых ощущений пациентов использовали десятибалльную шкалу (от 0 - слабая боль, до 10 - невыносимая боль).

5 Мониторинг проводили каждые 4 часа в первые и вторые сутки после операции.

Изучение анализируемых количественных признаков показало, что их распределение в исследуемой группе больных не соответствует закону нормального распределения: значения критерия Шапиро-Уилка составили $W=0,83-0,94$; с уровнем их статистической значимости $p<0,001$. Таким образом, для описания рассматриваемых количественных показателей нами применялась медиана (M_e) и интерквартильный размах ($Q_{25}-Q_{75}$), а при сравнении пациентов с разными генотипами по анализируемым показателям использовался непараметрический метод - критерий Манна-Уитни [Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA /О. Ю. Реброва. - [3-е изд.]. - Москва: Медиа Сфера, 2006. - 305 с.].

15 Установлено, что у индивидуумов с генотипами -889ТТ и -889СТ IL-1A боль была более выражена в 18 часов первых суток ($M_e=6$ баллов), чем у пациентов с генотипом -889СС ($M_e=5$ баллов). В 22 часа первых суток боль была более выражена у пациентов с генотипами -889ТТ и -889СТ IL-1A ($M_e=5$ баллов), чем у пациентов с генотипом -889СС ($M_e=4$ балла) (фиг. 3 и 4). Пациенты с ХКХ, имеющие генотипы -703СТ и -703ТТ локуса IL-5 -703C>T, испытывали более резкую боль в 8 часов вторых суток ($M_e=4$ балла) по сравнению с индивидуумами с генотипом -703СС ($M_e=3$ балла,) (фиг. 5).

25 Таким образом, полученные данные указывают на важную роль полиморфных маркеров IL-1A -889T>C и IL-5 -703C>T в формировании послеоперационного болевого синдрома у пациентов с ХКХ.

Примеры, подтверждающие осуществимость предложенного изобретения.

1. Генотипы -889ТТ и -889СТ IL-1A были выявлены у пациента Т. При дальнейшем наблюдении у данного пациента в 18 часов первых суток после холецистэктомии отмечался уровень боли, равный 6 баллам.

30 2. Генотипы -889ТТ и -889СТ IL-1A были выявлены у пациентки Н. При дальнейшем наблюдении у данной пациентки в 22 часа первых суток после холецистэктомии отмечался уровень боли, равный 5 баллам.

3. У пациента С. были выявлены генотипы -703СТ и -703ТТ локуса IL-5 -703C>T. При дальнейшем наблюдении удалось установить, что данный пациент испытывал резкую боль в 8 часов вторых суток, равную 4 баллам.

35 4. У пациента С. был выявлен генотип -703СС локуса IL-5 -703C>T. При дальнейшем наблюдении удалось установить, что данный пациент испытывал в 8 часов вторых суток боль, уровень которой был равен 3 баллам.

40 Использование данного способа позволяет прогнозировать интенсивность болевого синдрома в раннем послеоперационном периоде у больных хроническим калькулезным холециститом, русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья России, что будет способствовать своевременной профилактике выраженного болевого синдрома у пациентов с ХКХ после видеолaparоскопической холецистэктомии, что крайне важно для пациентов, имеющих в анамнезе сердечно-сосудистую патологию.

Формула изобретения

Способ прогнозирования интенсивности болевого синдрома в раннем

послеоперационном периоде у больных хроническим калькулезным холециститом, русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья России, включающий забор крови и выделение ДНК из периферической венозной крови, отличающийся тем, что после выделения ДНК, проводят анализ полиморфизмов генов IL-1A -889Т>С, IL-5 -703С>Т и прогнозируют более выраженную боль у больных хроническим калькулезным холециститом в 18 часов и в 22 часа первых суток после холецистэктомии в случае выявления генотипов -889ТТ и -889СТ IL-1A, прогнозируют интенсивные болевые ощущения в 8 часов вторых суток после операции при выявлении генотипов -703СТ и -703ТТ IL-5.

10

15

20

25

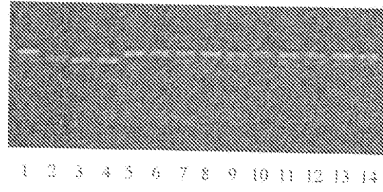
30

35

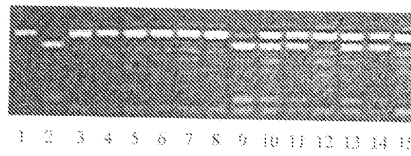
40

45

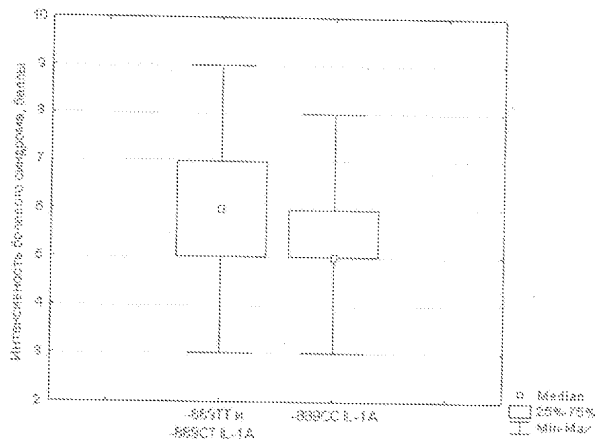
Способ прогнозирования интенсивности
болевого синдрома у больных хроническим
калькулезным холангитом в раннем
послеоперационном периоде



Фиг. 1

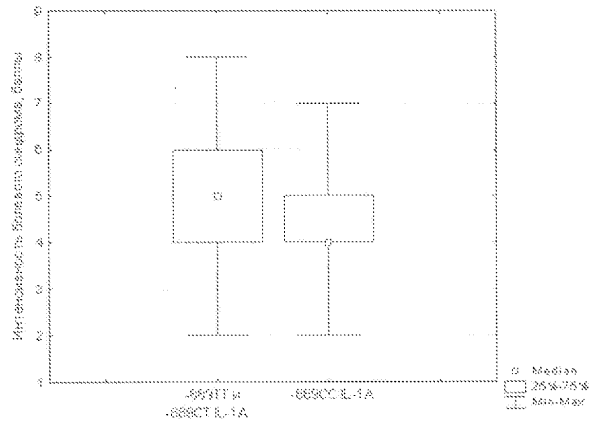


Фиг. 2

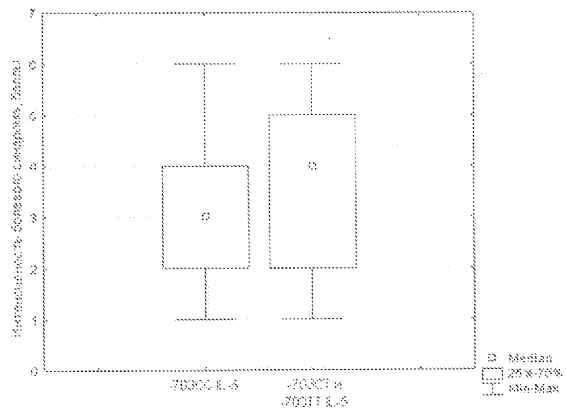


Фиг. 3

Способ прогнозирования интенсивности
 болевого синдрома у больных хроническим
 калькулезным холециститом в раннем
 постоперационном периоде



Фиг. 4



Фиг. 5