



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2015120373/15, 28.05.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
28.05.2015

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 28.05.2015

(45) Опубликовано: 27.05.2016 Бюл. № 15

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2438564 C1, 10.01.2012. RU 2436097 C2, 10.12.2011. PHAMDUONG E. et al. Acute and chronic mu opioids differentially regulate thrombospondins 1 and 2 isoforms in astrocytes. ACS Chem Neurosci. 2014 Feb 19; 5(2): 106-14. Epub 2013 Dec 5 [найдено 02.03.2016]. Найдено из Интернет: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3930990/>. CHEN W.C. (см. прод.)

Адрес для переписки:

672090, г. Чита, ул. Горького, 39а, Читинская меакадемия, патентный отдел

(72) Автор(ы):

Мироманов Александр Михайлович (RU),  
Гусев Кирилл Аркадьевич (RU),  
Мироманова Наталья Анатольевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
профессионального образования Читинская  
государственная медицинская академия  
Министерства здравоохранения Российской  
Федерации (RU)

## (54) СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ НАРУШЕНИЯ КОНСОЛИДАЦИИ ПРИ ПЕРЕЛОМАХ КОСТЕЙ КОНЕЧНОСТЕЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины, в частности к травматологии, и предназначено для прогнозирования нарушения консолидации при переломах костей конечностей. Осуществляют выделение ДНК, проводят анализ полиморфизмов гена TGFβ<sub>1</sub> и гена EGFR. При

выявлении генотипа -25Pro/Pro гена TGFβ<sub>1</sub> и генотипа -2073T/T гена EGFR прогнозируют вероятность развития нарушения консолидации перелома. Изобретение обеспечивает повышение точности прогноза. 1 табл., 3 пр.

(56) (продолжение):

et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphism is associated with calcium oxalate stone disease. Urol Res. 2003 Jul; 31(3): 218-22. Epub 2003 Apr 29.

RU 2 585 100 C1

RU 2 585 100 C1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*G01N 33/50* (2006.01)  
*C12Q 1/68* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2015120373/15, 28.05.2015**(24) Effective date for property rights:  
**28.05.2015**

Priority:

(22) Date of filing: **28.05.2015**(45) Date of publication: **27.05.2016** Bull. № 15

Mail address:

**672090, g. CHita, ul. Gorkogo, 39a, CHitinskaja  
medakademija, patentnyj otdel**

(72) Inventor(s):

**Miromanov Aleksandr Mikhajlovich (RU),  
Gusev Kirill Arkadevich (RU),  
Miromanova Natalya Anatolevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Gosudarstvennoe byudzhethnoe obrazovatelnoe  
uchrezhdenie vysshego professionalnogo  
obrazovaniya CHitinskaya gosudarstvennaya  
meditsinskaya akademiya Ministerstva  
zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii (RU)**(54) **METHOD FOR PREDICTION OF DISTURBED CONSOLIDATION ACCOMPANYING EXTREMITY FRACTURES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine, particularly to traumatology, and aims at prediction of disturbed consolidation accompanying extremity fractures. DNA is isolated, TGFβ<sub>1</sub> and EGFR gene polymorphisms are analysed. If genotype -25Pro/Pro

of TGFβ<sub>1</sub> gene and genotype -2073T/T of EGFR gene are observed, a probability of developing impaired fracture consolidation is predicted.

EFFECT: invention provides higher prediction accuracy.

1 cl, 1 tbl, 3 ex

RU 2 585 100 C1

RU 2 585 100 C1

Изобретение относится к медицине, а именно к травматологии, и может быть использовано для прогнозирования нарушения консолидации при переломах костей конечностей.

Актуальность изучения механизмов нарушений консолидации при переломах костей конечностей определяется значительной частотой возникновения данных осложнений, трудностью их лечения и высоким уровнем инвалидности [1, 2]. В последние десятилетия течение многих заболеваний и осложнений, в том числе и нарушений консолидации, значительно изменилось и приобрело скрытый характер, что представляет значительные сложности, как в диагностике, так и в лечении [3].

Известен «Способ диагностики нарушения регенерации костной ткани у травматологических больных» [4], основанный на определении в первые сутки травмы количества моноцитов в 1 мкл периферической крови, определении величины посттравматического отека и при отечности менее 2,5 см и количестве моноцитов менее  $2,5 \times 10^2$  мкл крови, а также при отечности более 5 см и количестве моноцитов более  $6,0 \times 10^2$  мкл крови диагностируют нарушение регенерации костной ткани у травматологических больных.

Данный способ недостаточно точен, так как, во-первых, дисбаланс моноцитов может регистрироваться при различных патологических состояниях [5]; во-вторых, не учитывается наиболее важный фактор нарушения регенерации костной ткани - генетическая обусловленность синтеза ростовых факторов [6, 7].

Известен «Способ оценки костной ткани при дистракционном остеосинтезе» [8], основанный на определении до операции и перед началом дистракции (на 7-10 сутки после операции) энергетики мононуклеаров крови, а именно определяют скорость эндогенного дыхания мононуклеаров и интенсивность дыхания в присутствии экзогенной янтарной кислоты методом полярографии. При уменьшении скорости эндогенного дыхания в конце послеоперационного периода менее 80%, а также значительном сдвиге интенсивности дыхания мононуклеаров в присутствии экзогенной янтарной кислоты более 130% определяют нарушение процесса регенерации кости при дистракционном остеосинтезе. При увеличении скорости эндогенного дыхания более 150% и активации дыхания мононуклеаров в присутствии экзогенной янтарной кислоты до 120% определяют благоприятное течение костного репаративного процесса.

Однако данный метод недостаточно точен, поскольку состояние костной ткани оценивается только по функциональной активности моноцитов крови, дисбаланс которой может регистрироваться при различных патологических состояниях [5], и не учитывается роль наследственной предрасположенности к экспрессии факторов роста, играющих ведущую роль в регенерации костной ткани [6, 7].

Описан способ прогнозирования нарушения регенерации костной ткани при переломах длинных трубчатых костей [9], основанный на определении относительного содержания уровня ростового фактора  $\beta_1$  (TGF $\beta$ 4), показателя лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии (ЛТА) и параметров микроциркуляции (максимальная амплитуда колебаний миогенного, нейрогенного и дыхательного компонентов колебаний кровотока), с последующим расчетом коэффициента по формуле -  $K = P_1 \times P_2 \times P_3$ . При значении коэффициента больше 0,9 прогнозируют благоприятное течение репаративного процесса, а если коэффициент меньше 0,9, прогнозируют развитие замедленной консолидации. Чувствительность предлагаемого способа прогнозирования составляет - 94,1%, точность - 92,8%, специфичность - 87,5%.

Однако, во-первых, данный способ достаточно сложный, так как при его

использовании необходим анализ значительного количества показателей, а во-вторых, не совсем точный, поскольку при его использовании не учитывается один из наиболее важных факторов регенерации костной ткани - генетически запрограммированный ответ на синтез ростовых факторов, играющих ведущую роль в консолидации переломов [6, 7].

Для упрощения способа и повышения точности прогноза нарушения консолидации при переломах в венозной крови больных при поступлении определяют полиморфизм гена  $TGF\beta_1$ -25Arg>Pro и EGFR-2073A>T и при выявлении генотипа -25Pro/Pro и генотипа -2073T/T прогнозируют развитие нарушения консолидации.

Способ выполняют следующим образом.

При госпитализации в клинику по поводу перелома у больного осуществляют забор 5,0 мл крови из локтевой вены в цитратную пробирку и выполняют молекулярно-генетический анализ образцов ДНК. Для исследования выбирают точковую мутацию  $TGF\beta_1$  в позиции 25 (Arg>Pro) и мутацию рецептора EGFR в позиции 2073 (A>T).

Аmplификацию фрагмента исследуемых генов проводят в термоцикле (модель Pe «Бис» - M111 (ООО «Бис-Н», Новосибирск). В работе используют стандартные наборы праймеров научно-производственной фирмы «ЛНТех»-«SNP» (Москва). Визуализацию продуктов амплификации выполняют с помощью электрофореза в 3% агарозном геле с добавлением бромистого этидия в проходящем в ультрафиолетовом свете [7].

Полученные данные трактуют следующим образом: при выявлении генотипа -25Pro/Pro гена  $TGF\beta_1$  и генотипа -2073T/T гена EGFR прогнозируют нарушение консолидации при переломах, а отсутствие данных генотипов свидетельствует о благоприятном течении процессов репарации костной ткани.

Доказано, что к одним из основных факторов, определяющих особенности исхода при переломах, относится иммунная система, нарушение которой может приводить к развитию нарушений консолидации [10]. Иммунные клетки секретируют многочисленные растворимые медиаторы (цитокины), играющие важнейшую роль в различных физиологических и патологических процессах организма. Одними из таких клеточных медиаторов, играющих важную роль в регуляции обменных и восстановительных процессов являются ростовые факторы - трансформирующий фактор роста  $\beta_1$  ( $TGF\beta_1$ ) и эпидермальный фактор роста (EGF) [6].  $TGF\beta_1$  активирует фибробласты, способствует процессам репарации ран и непосредственно стимулирует ангиогенез [11]. EGF стимулирует пролиферацию фибробластов и влияет на продукцию ими простагландинов, протеогликанов, коллагена, ростовых факторов и ряда цитокинов, включая колониестимулирующие факторы, интерлейкины и интерферон, что, в конечном итоге, способствует ускорению регенерации раневого процесса [12, 13]. EGF осуществляет свое действие с участием мембранного рецептора - EGFR, обладающего тирозинкиназной активностью и играющего ключевую роль при запуске внутриклеточных путей передачи сигнала [14].

Согласно исследованиям последних лет, ведущая роль в развитии осложнений отводится наследственным факторам. Генетически запрограммированный повышенный или пониженный синтез белков сказывается на способности иммунной системы человека реагировать на развитии целого ряда иммунопатологических процессов [6, 7, 11, 15]. Вследствие вышесказанного, выявление ассоциации той или иной патологии с определенным генотипом, в конечном итоге, может дать возможность для создания базы данных, позволяющей сделать долгосрочный индивидуальный прогноз для конкретного лица и провести необходимые терапевтические мероприятия для

предотвращения развития осложнений заболевания или снижения тяжести его протекания [7, 15].

Способ прогнозирования нарушения консолидации при переломах иллюстрируется следующими примерами.

5       Пример 1. Больной Т., 32 лет, госпитализирован с диагнозом: Закрытый оскольчатый перелом левой большеберцовой кости в средней трети, малоберцовой кости в верхней трети со смещением отломков. Пациенту выполнено оперативное вмешательство - открытая репозиция металлоостеосинтез пластиной. Послеоперационная терапия проводилась по общепринятым методам. При поступлении пациенту произведено  
10       исследование полиморфизма гена  $TGF\beta_1-25Arg>Pro$  и гена  $EGFR-2073A>T$ . Установлено, что у больного генотип  $-25Arg/Arg$  и генотип  $-2073A/T$  соответствующих генов. Прогнозировано благоприятное течение посттравматического периода. Послеоперационный период протекал без особенностей, заживление раны первичным натяжением. Терапия в послеоперационном периоде проводилась по стандартной  
15       методике (дезагреганты, лечебная физкультура, массаж). В последующем, при контрольном осмотре через 2 месяца - констатировано полное сращение перелома.

Пример 2. Больной Д., 36 лет, госпитализирован с диагнозом: Закрытый кривой перелом левой большеберцовой кости в средней трети со смещением отломков. Пациенту выполнено оперативное вмешательство - закрытая репозиция металлоостеосинтез  
20       интрамедуллярным блокируемым стержнем. При поступлении пациенту произведено исследование полиморфизма гена  $TGF\beta_1-25Arg>Pro$  и гена  $EGFR-2073A>T$ . Выявлен генотип  $-25Pro/Pro$  и генотип  $-2073T/T$  исследуемых полиморфизмов. Прогнозирована вероятность развития нарушения консолидации в позднем послеоперационном периоде, в результате чего на фоне традиционной терапии дополнительно проведен курс лечения  
25       препаратами, улучшающими микроциркуляцию, препаратами кальция. В раннем послеоперационном периоде осложнений не зафиксировано, однако через 2 месяца у больного рентгенологически отсутствовали признаки формирования костной мозоли, а через 6 месяцев после травмы пациенту выставлен диагноз - ложный сустав левой  
30       большеберцовой кости в условиях металлоконструкции и больной госпитализирован на повторное оперативное лечение.

Пример 3. Больной И., 31 лет, госпитализирован с диагнозом: Закрытый оскольчатый перелом левой большеберцовой кости в нижней трети, кривой перелом малоберцовой кости в верхней трети со смещением отломков. Пациенту выполнено оперативное  
35       вмешательство - открытая репозиция металлоостеосинтез пластиной и определен полиморфизм гена  $TGF\beta_1-25Arg>Pro$  и гена  $EGFR-2073A>T$ . Выявлен генотип  $-25Pro/Pro$  и генотип  $-2073T/T$  исследуемых полиморфизмов. Было предположено неблагоприятное течение позднего послеоперационного периода, в результате чего пациенту дополнительно назначен курс иммуномодулирующей терапии, препаратов,  
40       улучшающих микроциркуляцию, и препараты кальция. В последующем, при контрольном осмотре через 3 месяца - констатирована консолидация перелома.

Предложенный способ прогнозирования нарушения консолидации апробирован у 100 пациентов с переломами костей конечностей (табл.).

45       Таким образом, чувствительность, точность и специфичность предлагаемого способа прогнозирования составила 100%.

Следовательно, выявление генотипа  $-25Pro/Pro$  гена  $TGF\beta_1$  и генотипа  $-2073T/T$  гена  $EGFR$  у больных с переломами костей конечностей позволяет прогнозировать развитие нарушения консолидации на стадии доклинических проявлений и вносить необходимую

коррекцию в лечение данной группы пациентов.

#### Источники информации

1. Павлов, Д.В. Интрамедуллярный остеосинтез при лечении несросшихся переломов и ложных суставов большеберцовой кости / Д.В. Павлов, А.Е. Новиков // Травматология и ортопедия России. - 2009. - №2. - С. 106-111.
2. Сочетанное применение обогащенной тромбоцитами аутоплазмы и биокомпозиционного материала Коллапан в комплексном лечении больных с длительно несрастающими переломами и ложными суставами длинных костей конечностей / Г.А. Кесян, [и др.]. // Вестник травматологии и ортопедии. - 2011. - №2. - С. 26-32.
3. Мироманов, А.М. Переломы длинных костей конечностей: прогностические критерии развития осложнений / автореф. дис.... д-ра мед. наук: 14.01.15, 14.03.03 / Мироманов Александр Михайлович. - Курган, 2013. - 41 с.
4. Заявка на изобретение №4931220 от 26.04.1991. Способ диагностики нарушения регенерации костной ткани у травматологических больных / Гришин В.Н.
5. Теоретические и клинические аспекты биорегулирующей терапии в хирургии и травматологии / Б.И. Кузник [и др.]. - Новосибирск: Наука, 2008. - 311 с.
6. Кетлинский, С.А. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев. - СПб.: Фолиант, 2008. - 552 с.
7. Мироманов А.М. Полиморфизм гена  $TGF\beta_1$  (Arg25Pro) и гена EGFR (A2073T) у больных с нарушением консолидации переломов в Забайкальском крае / А.М. Мироманов, К.А. Гусев, С.А. Усков // Фундаментальные исследования. - 2014. - №10. - Ч. 7. - С. 1360-1364.
8. Заявка на изобретение №94041979 от 25.11.1994. Способ оценки костной ткани при дистракционном остеосинтезе / Осипенко А.В.
9. Патент №2436097, РФ, МПК G01N 33/50. Способ прогнозирования нарушения регенерации костной ткани при переломах длинных трубчатых костей / А.М. Мироманов и [др.]; заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия». №2010102454; заявл. 25.01.2010; опубл. 10.12.2011, Бюл. №34. - 10 с.
10. Мироманов А.М. Прогностические критерии развития осложнений при переломах костей конечностей / А.М. Мироманов, Е.В. Намоконов. - Чита: РИЦЧГМА, 2014. - 175 с.
11. Маленькая молекула и большая болезнь / А.С. Рудой и [др.] // Вестник Российской военно-медицинской академии. - 2009. - №3(27). - С. 166-172.
12. Feng, J. Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) and necrotizing enterocolitis / J. Feng, O.N. El-Assal, G.E. Besner // Semin. Pediatr. Surg. - 2005. - Vol. 14(3). - P. 167-174.
13. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor overexpression in transgenic mice increases resistance to necrotizing enterocolitis / A. Radulescu, H.Y. Zhang, X. Yu [et al.] // J. Pediatr. Surg. - 2010. - Vol. 45 (10). - P. 1933-1939.
14. Leahy, D.J. Structure and function of the epidermal growth factor (EGF/ErbB) family of receptors / D.J. Leahy // Advances in Protein Chemistry. - 2004. - Vol. 68. - P. 1-27.
15. Полиморфизм гена TNF- $\alpha$  (G-308A) у больных с гнойно-воспалительными осложнениями при переломах длинных костей конечностей в Забайкальском крае [Электронный ресурс] / А.М. Мироманов и [др.] // Забайкальский медицинский вестник. - 2013. - №1. - С. 41-45. - Режим доступа: <http://chitgma.ru/zmv2>.

Таблица

Значения полиморфизма гена  $TGF\beta_1-25Arg>Pro$  и гена  $EGFR-2073A>T$  в нарушении консолидации у пациентов с переломами костей конечностей ( $\chi^2$ ).

Генотип	Группа I (n=89)	Группа II (n=11)	Исход
<b>Полиморфизм гена <math>TGF\beta_1-25Arg&gt;Pro</math></b>			
Arg/Arg	58 (58%)	-	Благоприятный
Arg/Pro	31 (31%)	-	Благоприятный
Pro/Pro	-	11 (11%)*	Неблагоприятный
<b>Полиморфизм гена <math>EGFR-2073A&gt;T</math></b>			
A/A	32 (32%)	-	Благоприятный
A/T	57 (57%)	-	Благоприятный
T/T	-	11 (11%)*	Неблагоприятный

Примечание: \* - статистическая значимость различий между группами (при  $p<0,05$ ); I - группа больных (без нарушения консолидации перелома в позднем посттравматическом периоде); II - группа больных (нарушение консолидации в позднем послеоперационном периоде).

#### Формула изобретения

Способ прогнозирования нарушения консолидации при переломах костей конечностей, включающий исследования крови, отличающийся тем, что выделяют ДНК, проводят анализ полиморфизма гена  $TGF\beta_1-25Arg>Pro$  и гена  $EGFR-2073A>T$  и при выявлении генотипа  $-25Pro/Pro$  гена  $TGF\beta_1$  и генотипа  $-2073T/T$  гена  $EGFR$  прогнозируют вероятность развития нарушения консолидации перелома.