



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **96571** (13) **U**  
(51) МПК (2015.01)  
**A61B 10/00**  
**G01N 33/48** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: <b>u 2014 09409</b>	(72) Винахідник(и): <b>Запровальна Ольга Євгеніївна (UA), Бондар Тетяна Миколаївна (UA), Попович Ганна Сергіївна (UA), Рябуха Владислав Валерійович (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>26.08.2014</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>10.02.2015</b>	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.02.2015, Бюл.№ 3</b>	(73) Власник(и): <b>ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ ТЕРАПІЇ ІМЕНІ Л.Т. МАЛОЇ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ", пр. Постишева, 2-а, м. Харків, 61039 (UA)</b>
	(74) Представник: <b>Беседіна Алла Семенівна</b>

## (54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ РИЗИКУ РОЗВИТКУ СЕРЦЕВО-СУДИННИХ ПОДІЙ У ХВОРИХ З СЕРЦЕВО-СУДИННОЮ ПАТОЛОГІЄЮ

### (57) Реферат:

Спосіб прогнозування ризику розвитку серцево-судинних подій у хворих з серцево-судинною патологією, у якому методом полімеразної ланцюгової реакції проводять молекулярно-генетичне дослідження крові з ідентифікацією поліморфізму циклооксигенази (ЦОГ) як фактора ризику розвитку серцево-судинної патології. Додатково визначають фактор ризику розвитку серцево-судинної патології, пов'язаної з атеротромбозом, для цього ідентифікують поліморфний локус C50T (референтний SNP (rs) 3842787) гена ЦОГ-1 і, якщо в зазначеному поліморфному локусі наявний хоча б один мутантний Т-алель, свідчать про схильність до активації тромбоцитарної ланки тромбоутворення і прогнозують ризик розвитку серцево-судинних подій, пов'язаних з атеротромбозом.

UA 96571 U



Корисна модель належить до медицини, а саме до терапії та кардіології, та може бути використана для прогнозування за допомогою молекулярно-генетичних маркерів ризику розвитку атеротромботичних серцево-судинних подій при ішемічній хворобі серця, стабільній стенокардії і гострому коронарному синдромі.

Відомий "Спосіб віднесення хворих на стабільну стенокардію до групи ризику розвитку дестабілізації ішемічної хвороби серця" [Патент України № 73114 у, опубл. 10.09.2012, бюл. № 17], у якому у сироватці/плазмі крові визначають концентрацію імунологічних показників, зокрема прозапального інтерлейкіну-6 (ІЛ-6) і протизапального інтерлейкіну-10 (ІЛ-10). Додатково досліджують їх співвідношення, визначають індекс цитокинового балансу (ІЦБ) за формулою  $ІЦБ = ІЛ-6/ІЛ-10$ . Та у випадку, коли індекс запальної активності більше 70, роблять висновок про ризик розвитку дестабілізації ішемічної хвороби серця.

Відомий спосіб прогнозування ризику розвитку серцево-судинних подій або моніторингу перебігу серцево-судинного захворювання [Combination of sPLA2 activity and OxPL/apoB cardiovascular risk factors for the diagnosis/prognosis of a cardiovascular disease/event: Патент США № 8,361,732, опубл. 29.01.2013. Internet, БД USPTO (США)], який включає вимірювання у зразку крові прозапального маркеру - активності розчинної фосфоліпази А2 і ліпідного маркеру - концентрації окислених фосфоліпідів та аполіпропротеїну В-100. Розраховують співвідношення окислених фосфоліпідів та аполіпропротеїну В-100. Активність розчинної фосфоліпази А2 та співвідношення окислених фосфоліпідів та аполіпропротеїну В-100 порівнюють із референтними значеннями. За певними змінами зазначених показників свідчать про наявність або ризик розвитку серцево-судинного захворювання та/або серцево-судинних подій. При цьому під "серцево-судинними подіями" розуміють раптову серцеву смерть, гострі коронарні синдроми, такі як розрив бляшки, інфаркт міокарда, нестабільна стенокардія, а також несерцеві гострі події, такі як тромбози нижніх кінцівок, аневризми, інсульти та інші ішемічні події, коли переривається артеріосудинний кровотік та оксигенація.

Відомий також спосіб генетичної оцінки in vitro схильності пацієнта до розвитку серцево-судинних патологій, пов'язаних з розривом атеросклеротичної бляшки (Method And Kit For Assessing The Risk Of Cardiovascular Pathologies With Atheromatous Etiology: з. № US2008187906 (A1): МПК C12Q1/68/CIPOLLONE F. [IT]; MEZZETTI A. [IT]; MARTINOTTI S. [IT]; заявник GENE DESIGN & DEVELOPMENT [IT]; опубл. 2008.08.07, Internet, БД Espacenet (ЕРО) - вибраний за найближчий аналог. Суть найближчого аналога: у способі проводять молекулярно-генетичне дослідження крові з ідентифікацією поліморфізму прозапального маркеру циклооксигенази 2 (ЦОГ-2), що обумовлює нестабільність атеросклеротичної бляшки. Для цього ідентифікують поліморфний локус C436T (GenBank accession AF276953 COX-2 gene promotor SEQ ID NO: 1) гена ЦОГ-2, і за наявності гомозиготного ТТ генотипу свідчать про ризик розвитку серцево-судинної патології. Під серцево-судинною патологією розуміють: коронаропатію, патологію сонних артерій, інфаркт міокарда, стенокардію, гострий коронарний синдром, потребу у реваскуляризації міокарда.

Загальним недоліком аналогів є те, що у відомих способах при прогнозуванні ризику розвитку серцево-судинних подій враховують лише ризики, обумовлені прозапальними механізмами дестабілізації захворювання, що знижує вірогідність прогнозу та можливість призначення своєчасної та адекватної терапії.

В основу корисної моделі поставлена задача здійснити вибір специфічного генетичного маркеру, який надасть можливість одержати інформацію про стан тромбоцитарної ланки тромбоутворення, що забезпечить вірогідну оцінку ризику розвитку серцево-судинних подій, пов'язаних з атеротромбозом. А це дозволить на індивідуальному рівні своєчасно призначати патогенетично обґрунтовану терапію, що сприятиме зниженню захворюваності та смертності. Ця задача вирішується у способі прогнозування ризику розвитку серцево-судинних подій у хворих з серцево-судинною патологією, у якому методом полімеразної ланцюгової реакції проводять молекулярно-генетичне дослідження крові з ідентифікацією поліморфізму циклооксигенази (ЦОГ) як фактора ризику розвитку серцево-судинної патології.

Ознаки, що відрізняють корисну модель від найближчого аналога, є такі:

- визначають фактор ризику розвитку серцево-судинної патології, пов'язаної з атеротромбозом, для цього ідентифікують поліморфний локус C50T (референтний SNP (rs) 3842787 в базах даних NCBI) гена ЦОГ-1;

- і якщо в зазначеному поліморфному локусі наявний хоча б один мутантний Т-алель, свідчать про схильність до активації тромбоцитарної ланки тромбоутворення і прогнозують ризик розвитку серцево-судинних подій, пов'язаних з атеротромбозом.

Дослідження за запропонованою корисною моделлю були проведені у відділі атеросклерозу та ішемічної хвороби серця ДУ "Національний інститут терапії ім. Л.Т. Малої НАМН України".

Обстежено 173 хворих (84,6 % чоловіків і 15,4 % жінок віком від 35 до 75 років (середній вік  $58,2 \pm 0,7$  років) на хронічні форми ІХС, зокрема 56 хворих зі стабільною стенокардією напруження 2-3 класу. Саме за даними власних оригінальних досліджень (науково-дослідна робота) у 20 хворих на хронічні форми ІХС визначено, що вони є носіями мутантного Т-алеля поліморфізму С50Т гена ЦОГ-1 і на цій підставі прогнозують ризик розвитку атеротромботичних серцево-судинних подій (смертність, нефатальний інфаркт міокарда / нестабільна стенокардія).

Математичну обробку даних здійснено на персональному комп'ютері з використанням статичної програми "Statistica". Вірогідність різниць оцінювали за критерієм t-Ст'юдента. Взаємозв'язок між показниками встановлювали за коефіцієнтом кореляції Пірсона. Для оцінки можливого впливу досліджуваних поліморфних маркерів на ймовірність розвитку несприятливих серцево-судинних подій розраховували відношення шансів (OR, odds ratio) з довірчим інтервалом (СІ) 95 %.

Запропоновану корисну модель здійснюють таким чином:

1. Для підтвердження наявності серцево-судинного захворювання, здійснюють оцінку клінічного стану пацієнта за скаргами, даними фізикального обстеження, анамнезу. Оцінюють результати загальноприйнятих клініко-інструментальних обстежень (електрокардіографії, ультразвукових обстежень серця та нирок, рентгеноскопичного обстеження органів грудної клітини, рівень артеріального тиску (АТ)) та біохімічних досліджень сироватки крові та сечі.

2. Для прогнозування ризику розвитку серцево-судинних подій, пов'язаних з атеротромбозом, хворим за допомогою відомого методу полімеразної ланцюгової реакції проводять молекулярно-генетичне дослідження крові. Згідно з корисною моделлю, визначають фактор ризику розвитку серцево-судинних патологій, пов'язаних з атеротромбозом. Для цього ідентифікують поліморфний локус С50Т гена ЦОГ-1, який специфічно контролює тромбоцитарну ланку тромбоутворення. Для цього здійснюють забір крові з ліктьової вени з використанням як антикоагулянта 3,8 % розчин цитрату натрію в співвідношенні 1:9.

Виділяють ДНК з цільної крові методом афінної сорбції ДНК на силікагелі, зокрема за допомогою комерційного набору "ДНК-сорб-В" ("Амплісінс", Російська Федерація) у відповідності з інструкцією до набору. Виділені зразки до проведення ампліфікації зберігають при - 20 °С.

Ампліфікацію виділеної ДНК проводять в автоматичному режимі на термоциклері з використанням комерційного набору реактивів, зокрема "GenePak PCR Core" (Лабораторія "NEOGENE", Україна).

Як специфічні праймери використовують наступні праймери: прямий - 5'-AGCCSCTCATCTCTCTCTGCA-3'; та зворотний: 5'-GAGGGATGGGGCCGCCTACCT-3.

Ампліфікацію фрагмента гена ЦОГ1 довжиною 131 п.н., обмеженого прямим та зворотним праймерами, проводять при наступних умовах:

	Температура	Час	Кількість циклів
Температурний режим	95 °С	5 хв.	1
	94 °С	1 хв.	30
	64 °С	1 хв.	
	72 °С	1 хв.	
	72 °С	5 хв.	1

Чистоту виділення ДНК та ефективність процесу ампліфікації перевіряють шляхом проведення горизонтального електрофорезу зразків ДНК в 2,5 % агарозному гелі в присутності 1хТБЕ (50 мМ трис-Н<sub>3</sub>ВО<sub>3</sub> та 2 мМ ЕДТА, рН 8,0), забарвленому етидіум бромідом впродовж 40 хв при 120 V із подальшими візуалізацією результатів в УФ-світлі та фотографуванням.

Як маркер довжини фрагментів використовують маркер з шагом не більше 50 пар нуклеотидів, зокрема GeneRuler 50bp DNA Ladder ("Fermentas", Литва).

Отримані ампліфікати піддають гідролізу за допомогою специфічної ендонуклеази рестрикції Faul (5 одиниць активності/пробу при температурі 37 °С протягом 4 годин), яка гідролізує ампліфікат довжиною 131 п.н. на фрагменти 57 п.н. та 74 п.н. тільки у випадку присутності цитозину у 50 позиції ампліфікату.

Продукти рестрикції поліморфних ділянок генів ЦОГ-1 розділяють за допомогою горизонтального електрофорезу в 2,5 % агарозному гелі в присутності 1хТБЕ (50 мМ трис-Н<sub>3</sub>ВО<sub>3</sub> та 2 мМ ЕДТА, рН 8,0), забарвленому етидіумом бромідом впродовж 1 години при 80V із подальшими візуалізацією результатів в УФ-світлі та фотографуванням.

При виявленні на електрофореграмі 2 смуг, що відповідають 57 п.н. та 74 п.н. свідчать про наявність 2 диких алелів (гомозиготний СС-генотип). При виявленні 3 смуг, що відповідають

131 п.н., 57 п.н. та 74 п.н свідчать про наявність 1 мутантного Т-алеля (гетерозиготний СТ-генотип), а при виявленні 1 смуги, що відповідає 131 п.н., свідчать про наявність 2 мутантних Т-алелів (гомозиготний генотип ТТ).

3. І якщо в поліморфному локусі С50Т гена ЦОГ-1 наявний хоча б один мутантний Т-алель, прогнозують ризик розвитку серцево-судинних подій, пов'язаних з атеротромбозом.

Можливість використання корисної моделі у медичній практиці підтверджується на прикладах з хворими при ішемічній хворобі серця.

Приклад 1. Хвора К., 67 р. (історія хвороби 2238), госпіталізована у клініку Національного інституту терапії ім. Л.Т. Малої НАМН України зі скаргами на біль за грудиною, що виникав при ходьбі на дистанцію до 300 метрів, який припиняється при застосуванні нітрогліцерину через 1-2 хвилини, а також виникає при ході з прискоренням.

Із анамнезу відомо, що пацієнтка хворіє на ІХС з 2004 року. У 2011 перенесла гострий інфаркт міокарда, а потім - аорто-коронарне шунтування. Через 2 роки, незважаючи на постійний прийом усіх рекомендованих за стандартом лікування препаратів (ацетилсаліцилова кислота (АСК), статини, бета-блокатори, інгібітори АПФ), відновилися приступи стенокардії.

На підставі скарг, анамнезу, об'єктивного огляду, даних додаткових методів дослідження (загальні та біохімічні дослідження, інструментальні методи - ЕКГ, УЗД), був уточнений діагноз: ІХС (стабільна стенокардія напруги III функціональний клас); післяінфарктний (2011 р. інфаркт міокарда із зубцем Q) кардіосклероз. Атеросклероз коронарних артерій (КАГ 2011). Аорто-коронарне шунтування (АКШ-2). Гіпертонічна хвороба III ступеня, 3 стадія, дуже високий серцево-судинний ризик; серцева недостатність ІІА стадії, III функціональний клас.

Для прогнозування ризику розвитку серцево-судинних подій хворій за допомогою відомого методу полімеразної ланцюгової реакції проводять молекулярно-генетичне дослідження крові. Згідно з корисною моделлю, визначають фактор ризику розвитку серцево-судинних патологій, пов'язаних з атеротромбозом. Для цього ідентифікують поліморфний локус С50Т гена ЦОГ-1, який специфічно контролює тромбоцитарну ланку тромбоутворення. У хворій в зазначеному поліморфному локусі ідентифіковано один мутантний Т-алель, що свідчить про схильність до активації тромбоцитарної ланки тромбоутворення. На цій підставі ризик розвитку серцево-судинних подій, пов'язаних з атеротромбозом, визначено як високий та запропоновано нагляд у лікаря не рідше ніж 1 раз у 6 місяців.

Під час річного спостереження у черговий візит виявлено дестабілізацію перебігу ІХС (зниження толерантності до фізичного навантаження на фоні негативної динаміки ЕКГ). Хвору було своєчасно госпіталізовано із діагнозом: ІХС, нестабільна стенокардія (прогресуюча стенокардія напруги), проведено курс стаціонарного лікування з подальшим призначенням довгострокової подвійної антитромбоцитарної терапії (АСК в дозі 75 мг/добу та клопідогрель в дозі 75 мг/добу). За період подальшого спостереження дестабілізації перебігу ІХС не відзначалося.

Приклад 2.

Хвора П., 68 років, звернулася до клініки Національного інституту терапії ім. Л.Т. Малої НАМН України зі скаргами на дискомфорт за грудиною, що виникає у спокої та при незначному навантаженні (ходьба 500-700 метрів) та проходить самостійно при зупиненні навантаження.

Із анамнезу відомо, що пацієнтка хворіє на ІХС більше 12 років, Перенесла аорто-коронарне шунтування у 2005 році. Протягом останнього часу з метою лікування стабільної стенокардії та профілактики серцево-судинних подій постійно приймає АСК 75 мг/добу та стандартну терапію (бета-адреноблокатор бісопролол, гіполіпідемічний препарат аторвастатин) без перерви. Діагноз був уточнений на підставі скарг, анамнезу, об'єктивного огляду, даних додаткових методів дослідження (загальні та біохімічні дослідження, інструментальні методи - ЕКГ, УЗД та ВЕМ). Діагноз: ІХС (стабільна стенокардія напруги III функціональний клас); атеросклероз коронарних артерій (КАГ 2005). Аорто-коронарне шунтування (АКШ-2, МКШ-1). Гіпертонічна хвороба III ступеня, 3 стадія, дуже високий серцево-судинний ризик; серцева недостатність ІІА стадії, III функціональний клас.

Для прогнозування ризику розвитку серцево-судинних подій, пов'язаних з атеротромбозом, хворим за допомогою відомого методу полімеразної ланцюгової реакції проводять молекулярно-генетичне дослідження крові. Згідно з корисною моделлю, визначають фактор ризику розвитку серцево-судинних патологій, пов'язаних з атеротромбозом. Для цього ідентифікують поліморфний локус С50Т гена ЦОГ-1, який специфічно контролює тромбоцитарну ланку тромбоутворення. У хворій було ідентифіковано СС-генотип поліморфізму С50Т гена ЦОГ-1, тобто наявності мутантного Т-алелю виявлено не було. Прогнозують відсутність ризику розвитку серцево-судинних подій, пов'язаних з атеротромбозом. Пацієнтка

продовжила лікування та спостереження за попередньою схемою. За подальший період дестабілізації перебігу ІХС не відзначалося.

- 5 Технічний результат. Використання корисної моделі у медичній практиці забезпечить можливість вірогідної оцінки ризику розвитку серцево-судинних подій, пов'язаних з атеротромбозом. А це дозволить на індивідуальному рівні своєчасно призначати патогенетично обґрунтовану терапію, що сприятиме зниженню захворюваності та смертності.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 10 Спосіб прогнозування ризику розвитку серцево-судинних подій у хворих з серцево-судинною патологією, у якому методом полімеразної ланцюгової реакції проводять молекулярно-генетичне дослідження крові з ідентифікацією поліморфізму циклооксигенази (ЦОГ) як фактора ризику розвитку серцево-судинної патології, який **відрізняється** тим, що визначають фактор ризику розвитку серцево-судинної патології, пов'язаної з атеротромбозом, для цього
- 15 ідентифікують поліморфний локус C50T (референтний SNP (rs) 3842787) гена ЦОГ-1 і, якщо в зазначеному поліморфному локусі наявний хоча б один мутантний Т-алель, свідчать про схильність до активації тромбоцитарної ланки тромбоутворення і прогнозують ризик розвитку серцево-судинних подій, пов'язаних з атеротромбозом.

---

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

---

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