



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **75386** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
A61B 10/00
G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 06985	(72) Винахідник(и): Фіщук Лілія Євгенівна (UA), Горовенко Наталія Григорівна (UA), Подольська Світлана Володимирівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 07.06.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 26.11.2012	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 26.11.2012, Бюл.№ 22	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ГЕНЕТИЧНОЇ ТА РЕГЕНЕРАТИВНОЇ МЕДИЦИНИ НАМН УКРАЇНИ", вул. Вишгородська, 67, м. Київ, 04114 (UA)

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ РОЗВИТКУ ГІПЕРТОНІЧНОЇ ХВОРОБИ У ЖІНОК

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування розвитку гіпертонічної хвороби у жінок включає проведення молекулярно-генетичних досліджень. Проводять дослідження поліморфного варіанта C-108T гена PON1 і при наявності T-108 алеля і T-108T генотипу гена PON1 роблять висновок про підвищений ризик розвитку ГХ.

U
UA 75386

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме до молекулярної генетики і кардіології, й може бути використана з метою профілактики гіпертонічної хвороби (ГХ) у жінок.

Гіпертонічна хвороба займає провідне місце серед захворювань серцево-судинної системи і є одним з найпоширеніших неінфекційних захворювань в Україні та всьому цивілізованому світі.

5 Це захворювання дуже небезпечне своїми ускладненнями, які пов'язані з ураженням життєво-важливих органів, а саме серця, головного мозку, нирок, що відбуваються внаслідок зміни в судинах при довгостроковому і стабільно підвищеному артеріальному тиску, а також в результаті хронічної ішемії органів. Особливістю перебігу гіпертонічної хвороби є безсимптомність або малосимптомність, що призводить до пізньої діагностики захворювання, коли вже з'являються ускладнення. Вищезазначене визначає необхідність розробки способів прогнозування розвитку ГХ, що дуже важливо для оптимізації профілактики цього захворювання.

15 Загальновизнані фактори ризику мають значення як для чоловіків, так і для жінок, але в останні роки тендерним відмінностям приділяється особлива увага, оскільки для жінок існують "додаткові" фактори ризику, серед яких вагітність і лактація, гормональна контрацепція, фізіологічна або штучно викликана менопауза, відмінна від чоловіків реакція на деякі лікарські засоби. Враховуючи все вищевикладене, прогнозування розвитку гіпертонічної хвороби у жінок є актуальною задачею.

20 Відомі способи прогнозування виникнення ГХ: спосіб, який включає проведення велоергометричного тестування та оцінки реакції гемодинаміки на субмаксимальне фізичне навантаження у обстежуваних осіб з визначенням агрегаційних можливостей тромбоцитів [Пат. №31748 А UA, МПК А61В 5/02. Опубл. 15.12.2000, бюл. № 7] та спосіб, який реалізується шляхом розрахунку діагностичного коефіцієнта на основі дерматогліфічних ознак долонь і пальців та спадкової обтяженості обстежуваного [Пат. №7805 U UA, МПК А61В 5/107. Опубл. 25 15.07.2005, бюл. № 7]. Серед основних недоліків наведених методів можна назвати те, що вони є трудомісткими та суб'єктивними, оскільки залежать від кваліфікації спеціаліста, який проводить обстеження.

Також існує спосіб прогнозування розвитку ГХ, при якому, у виявлених осіб з підвищеним артеріальним тиском, додатково визначають групу крові і резус-фактор, і при позитивному резус-факторі прогнозують можливість розвитку гіпертонії [Пат. №60684 А UA, МПК А61В 5/02, G01N 33/48. Опубл. 15.10.2003, бюл. № 10]. Цей спосіб дозволяє прогнозувати розвиток захворювання на ранніх етапах, але за його допомогою неможливо спрогнозувати ризик розвитку захворювання у ще здорових людей.

35 Найбільш близьким до запропонованого, а тому прийнятий нами за прототип, є спосіб прогнозування гіпертензії з урахування поліморфізмів генів [Пат. №29994 U UA, МПК (2006) А61В 10/00. Опубл. 11.02.2008, бюл. №3], що включає встановлення сімейного генетичного імпринтингу та додаткове визначення поліморфних варіантів А1166С гена рецептора ангіотензину II першого типу, I/D гена ангіотензинперетворюючого ферменту, Arg389Gly β_1 -адренорецептора, T894G ендотеліальної NO-синтази та Prol2A1a PPAR- γ_2 рецептора. 40 Спільними ознаками запропонованого способу та прототипу є дослідження поліморфних варіантів генів для прогнозування ризику розвитку серцево-судинних захворювань. Серед недоліків вибраного прототипу можна назвати високий рівень суб'єктивізму при встановленні сімейного генетичного імпринтингу та необхідність витратити великі кошти при індивідуальному дослідженні вказаних поліморфізмів. Також недоліком вибраного прототипу є те, що програма обстеження не враховує тендерні особливості.

45 В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб прогнозування ризику розвитку гіпертонічної хвороби у жінок шляхом визначення генотипу за поліморфним варіантом С-108Т гена PON1, що дозволить більш інформативно та з меншими затратами сформувати групи високого ризику для того, щоб здійснити заходи з профілактики даної патології.

50 Поставлена задача вирішується тим, що в способі, який включає проведення молекулярно-генетичних досліджень, згідно з корисною моделлю, проводять дослідження поліморфного варіанта С-108Т гена PON1 і при наявності Т-108 алеля і Т-108Т генотипу гена PON1 роблять висновок про підвищений ризик розвитку ГХ.

Спосіб здійснюється таким чином: виконується забір біологічного матеріалу та проводиться молекулярно-генетичне дослідження поліморфного варіанта С-108Т гена PON1.

Як матеріал для аналізу використовують периферичну кров або зішкріб зі щок. Виділення ДНК із біоматеріалу проводиться хлорфенольним методом або із використанням комерційного комплексу реагентів для виділення ДНК (не є предметом даного патенту).

60 Генотипування за поліморфним варіантом С-108Т гена PON1 проводили методами полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і рестрикційного аналізу (поліморфізм довжини

рестрикційних фрагментів -ПДРФ). ПЛР проводили з використанням послідовностей праймерів: 5'-AGCTAGCTGCCGACCCGGCGGGGAGGAG-3' і 5'-GGCTGCAGCCCTCACCACAACCC-3'. Умови ПЛР: ДНК денатурували протягом 4 хв. при 94 °С; 35 циклів: плавлення - 94 °С-30 сек., відпал 68 °С-30 сек., синтез 72 °С-60 сек.; пролонгований синтез 72 °С-2 хв.

Продукти ампліфікації, довжиною 240 пар нуклеотидів (п.н.), піддавали рестрикції шляхом додавання в рестрикційну суміш аліквот продуктів ПЛР об'ємом 2,5 мкл і 10 одиниць активності ендонуклеази рестрикції BsrBI з подальшою інкубацією при 37 °С протягом 16-ти годин. Детекцію продуктів ампліфікації та ПДРФ проводили в 2 % агарозному гелі, що містив 18 мкл етидію броміду. Візуалізацію результатів здійснювали в ультрафіолетовому світлі за допомогою відеосистеми для документування гелів. Довжини фрагментів аналізували шляхом порівняння з ДНК-маркером (DNA Ladder).

При дослідженні поліморфізму гена PON1 наявність фрагмента ДНК розміром 240 пар нуклеотидів (п.н.) відповідає генотипу Т-108Т, наявність трьох фрагментів довжиною 240 п.н., 212 п.н. і 28 п.н. - генотипу С-108Т, а наявність двох фрагментів довжиною 212 п.н. і 28 п.н. - генотипу С-108С.

Запропонованим способом було проведено обстеження 131 жінок з діагнозом - гіпертонічна хвороба II ступеня. Діагноз було встановлено лікарями спеціалізованих відділень. Як контроль обстежували групу із 185 жінок без серцево-судинної патології та інших інвалідизуючих захворювань.

Формування бази даних і статистичні розрахунки здійснювались з використанням програмних пактів Statistica 6.0 та MS Excel 2003. Для порівняння розподілення частот генотипів та алелів між групами хворих та контролю використовували критерій χ^2 Пірсона. Про асоціацію алелів або генотипів зі схильністю до захворювань оцінювали за величиною відношення шансів (OR) з 95 % довірчим інтервалом (CI). Статистично достовірними вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати молекулярно-генетичного аналізу поліморфізму С-108Т гена PON1 в досліджуваних групах наведено в таблиці.

Таблиця

Генотип або алель		Хворі на ГХ (n=131)		Контроль (n=185)		χ^2	P	OR (CI)
		n	%	n	%			
Генотип	С-108С	28	21,37	59	31,89	4,25	0,0416	0,58 (,35-0,98)
	С-108Т	64	48,85	96	51,89	нр*	нр*	нр*
	Т-108Т	39	29,77	30	16,22	8,26	0,0055	2,19(1,27-3,76)
Алель	С-108	120	0,46	214	0,58	8,92	-	0,62 (0,45-0,85)
	Т-108	142	0,54	156	0,42			1,62(1,18-2,23)

*нр - недостовірний різниця між групами

Очевидно, що відносний ризик розвитку ГХ асоційований з наявністю алеля Т-108 (OR=1,62, CI_{OR} 1,18-2,23), крім того, він порівняно вищий у осіб з генотипом Т-108Т (OR=2,19, CI_{OR} 1,27-3,76). На противагу, наявність генотипу С-108С може мати протективну дію, про що свідчить показник OR.

Технічним результатом, що досягається запропонованим способом є прогнозування ризику розвитку ГХ у жінок, які мають Т-108 алель і Т-108Т генотип гена PON1, що дозволяє сформувати групи ризику розвитку ГХ. Для таких жінок можна рекомендувати контроль факторів ризику серцево-судинних захворювань, корекцію способу життя шляхом проведення профілактичних заходів, що дозволило б суттєво знизити ризик розвитку ГХ. В порівнянні з прототипом спосіб є інформативним та не вимагає великих коштів.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозування розвитку гіпертонічної хвороби у жінок, що включає проведення молекулярно-генетичних досліджень, який **відрізняється** тим, що проводять дослідження поліморфного варіанта С-108Т гена PON1 і при наявності Т-108 алеля і Т-108Т генотипу гена PON1 роблять висновок про підвищений ризик розвитку ГХ.

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

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