



МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **117453** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/50 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2017 00582</p> <p>(22) Дата подання заявки: 23.01.2017</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 26.06.2017</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 26.06.2017, Бюл.№ 12</p>	<p>(72) Винахідник(и): Матлай Ольга Іванівна (UA), Гарбузова Вікторія Юрївна (UA), Снегірьова Інна Олександрівна (UA), Обухова Ольга Анатоліївна (UA), Дубовик Євген Іванович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, 40007 (UA)</p>
--	---

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ВИНИКНЕННЯ ІШЕМІЧНОГО АТЕРОТРОМБОТИЧНОГО ІНСУЛЬТУ (ІАТІ) З УРАХУВАННЯМ ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНА МЕТИЛЕНТЕТРАГІДРОФОЛАТРЕДУКТАЗИ (МТНFR)

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування виникнення ішемічного атеротромботичного інсульту (ІАТІ) з урахуванням поліморфізмів гена метилентетрагідрофолатредуктази (МТНFR) включає визначення С677Т поліморфізму гена МТНFR. Додатково індивідуально визначають А1298С поліморфізм гена МТНFR і при наявності носійства мінорного алеля за двома поліморфізмами С677Т та А1298С гена МТНFR роблять висновок про зростання ризику розвитку ІАТІ.

UA 117453 U

Корисна модель належить до галузі клінічної та теоретичної медицини, а саме до внутрішніх хвороб, неврології, патофізіології та медичної генетики, і може бути використана з метою прогнозування та профілактики ішемічного атеротромботичного інсульту (ІАТІ).

5 Судинні захворювання головного мозку є однією з найактуальніших медико-соціальних проблем сучасності та основним чинником, що спричиняється до смерті та інвалідизації населення планети [Зозуля І.С. Інсульт: тактика, стратегія ведення, профілактика, реабілітація та прогнози: посібник для лікаря / І.С. Зозуля, Ю.І. Головченко, О.П. Онопрієнко. Київ, 2010. 320 с.]. Особливо небезпечними є гострі порушення мозкового кровообігу, в першу чергу ішемічний атеротромботичний інсульт.

10 Аналіз динаміки захворюваності на інсульт за останні десятиріччя свідчить про стійку тенденцію до зростання на 0,5 2% за 1 рік [Мищенко Т.С. Аналіз епідеміології цереброваскулярних хвороб в Україні / Т.С. Мищенко // Судинні захворювання головного мозку. 2010. № 3. С. 2-9]. На жаль, в Україні показники захворюваності та смертності, пов'язані з ураженнями судин головного мозку, вищі, ніж середні показники в європейських країнах [Мищенко Т.С. Фактори ризика і клінічні особливості у больових с різних підтипами ішемічного інсульту / Т.С. Мищенко, Н.В. Овсянникова, В.В. Лебединец // Международный медицинский журнал. 2011. № 3. С. 27-32].

20 Патофізіологічною основою більшості серцево-судинних хвороб є атеросклеротичний процес [Ischemic Heart Disease. 130 Questions & Answers / R. Ferrari, M. Lettino, C. Seconi et al. 2-nd Edition. Paris: Fransa Servier, 2006. 305 p.]. Провідним патофізіологічним механізмом ураження судин є ендотеліальна дисфункція, основним ініціюючим чинником якої часто являється гомоцистеїн [Волошин П.В. Эндотелиальная дисфункция у больных с церебральным ишемическим инсультом: пол, возраст, тяжесть заболевания, новые возможности медикаментозной коррекции / П.В. Волошин, В.А. Малахов, А.Н. Завгородняя // Международный неврологический журнал. 2007. № 2(12). С. 15 20; Евтушенко С.К. Роль гомоцистеина в развитии ишемических инсультов у лиц молодого возраста (обзор литературы и личные наблюдения) / С.К. Евтушенко, Д.А. Филимонов // Международный неврологический журнал. - 2013. № 7(61). С. 19-30].

30 Відомо, що підвищення рівня гомоцистеїну в крові має виражений атерогенний і тромбофілітичний ефекти [Арзуманян Е.С. Механизмы токсического действия гомоцистеиновой кислоты на нейрональные клетки / Е.С. Арзуманян, М.С. Степанова // Нейрохимия. - 2010. - № 27(3). С. 251-256; Boldyrev A.A. Molecular mechanisms of homocysteine toxicity / A.A. Boldyrev // Biochemist (Mosc). 2009. - № 74(6). - P. 589-598; Borowczyk K. Metabolism and neurotoxicity of homocysteine thiolactone in mice: evidence for a protective role of paraoxonase / K. Borowczyk, D.M. Shih, H. Jakubowski // J. Alzheimers. Dis. - 2012. - № 30(2). - P. 225-231]. Епідеміологічні дослідження підтвердили, що гомоцистеїн (незалежним фактором ризику атеросклерозу і його тяжких ускладнень ішемічного атеротромботичного інсульту, інфаркту міокарда, тромбоемболії [Bostom A.G. Homocysteine and arteriosclerosis: Subclinical and clinical disease associations / A.G. Bostom, J. Selhub // Circulation. - 1999. - Vol. 99. - P. 2361-2363; Moat S.J. Plasma total homocysteine: instigator or indicator of cardiovascular disease / S.J. Moat // Ann. Clin. Biochem. - 2008. - Vol. 45. - P. 345-348].

45 Ішемічний атеротромботичний інсульт (ІАТІ) належить до категорії мультифакторіальних захворювань, в основі формування яких лежить складна взаємодія генетичних факторів і факторів зовнішнього середовища [Атаман О.В. Патофізіологія: підручник: в 2 т. Т. 1. Загальна патологія / О.В. Атаман. - Вінниця: Нова Книга, - 2012. - 592 с.; Ischemic stroke in Ukrainian population: possible involvement of the F2 G20210A, F5 G1691A and MTHFR C677T gene variants / P.F. Tatarsky, A.M. Kucherenko, S.A. Kravchenko et al. // Biopolymers and Cell. - 2010. - Vol. 26, № 4. - P. 299-305]. Аналітичними дослідженнями ВООЗ доведено, що традиційні підходи до профілактики, діагностики та лікування більшості поширених мультифакторіальних хвороб, у тому числі й церебральних, малоефективні й призводять до істотних економічних витрат [Мітенко Т.С. Аналіз епідеміології цереброваскулярних хвороб в Україні / Т.С. Мищенко // Судинні захворювання головного мозку. - 2010. - № 3. - С. 2-9]. З розвитком молекулярно-генетичних технологій з'явилися широкі можливості для вивчення генетичної складової цих захворювань.

55 Ураховуючи провідне значення ферменту метилентетрагідрофолатредуктази у метаболізмі гомоцистеїну, можна припустити, що поліморфізм його гена може мати зв'язок з розвитком ендотеліальної дисфункції та ішемічного інсульту.

60 Сьогодні описано понад 600 однонуклеотидних поліморфізмів гена MTHFR, деякі з них можуть впливати на активність ферменту та викликати підвищення рівня гомоцистеїну крові [Characterization of six novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in patients with homocystinuria / S. Sibani, B. Christensen, E. O'Ferrall et al. // Hum. Mutat. - 2000. - №

15(3). - P. 280-287; Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) / P. Goyette, A. Pai, R. Milos et al. // *Mamm. Genome.* - 1998. - Vol. 9. P. 652-656; The human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes: genomic organization, mRNA structure and linkage to the CLCN6 gene Original Research Article / Derval J. Gaughan, Sandrine Barbaux, Leo A.J. Kluijtmans, Alexander S. Whitehead // *Gene.* - 2000. - October 31. - Vol. 257, Issue 2. - P. 279-289]. Доведено найбільше патогенетичне значення двох із них C677T в екзоні 4 (rs1801133) та A1298C в екзоні 7 (rs1801131) [Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) / P. Goyette, A. Pai, R. Milos et al. // *Mamm. Genome.* - 1998. - Vol. 9. - P. 652-656; The human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes: genomic organization, mRNA structure and linkage to the CLCN6 gene Original Research Article / Derval J. Gaughan, Sandrine Barbaux, Leo A. J. Kluijtmans, Alexander S. Whitehead // *Gene.* - 2000. - October 31. - Vol. 257, Issue 2. - P. 279-289]. Описано вплив поліморфних варіантів C677T та A1298C гена MTHFR на розвиток серцево-судинних захворювань [Synergistic Effects of Prothrombotic Polymorphisms and Atherogenic Factors on the Risk of Myocardial Infarction in Young Males / A. Inbal, D. Freimark, B. Modan et al. // *Blood.* - 1999. - Vol. 93, № 7 (April 1). - P. 2186-2190; The TT genotype of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism is associated with the extent of coronary atherosclerosis in patients at high risk for coronary artery disease / A. Gardemann, H. Weidemann, M. Philipp et al. // *European. Heart. Journal.* - 1999. - Vol. 20. - P. 584-592], порушень вагітності та дефектів ембріонального розвитку [C677T and A1298C Mutations in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene in Patients with Recurrent Abortion from the Iranian Azeri Turkish / Morteza Bagheri, Isa Abdi Rad, Mir Davood Omrani et al. // *International Journal of Fertility and Sterility.* - 2010, Oct. - Dec. - Vol. 4, № 3. - P. 134-139; Genetic polymorphisms of MTHFR (677T AND 1298C) and homocysteine metabolism as maternal risk factor for down's syndrome patients in north indian population / Sanjeev Kumar Pandey, Pankaj Kumar Mohanty, Sunil Kumar Polipalli, Seema Kapoor // *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* - 2013, Apr. - Vol. 4 (2). - P. 249-256], онкологічних хвороб [Association of polymorphisms MTHFR C677T and A1298C with risk of colorectal cancer, genetic and epigenetic characteristic of tumors, and response to chemotherapy / A.M. Fernández-Peralta, L. Daimiel, N. Nejda et al. // *Int. J. Colorectal. Dis.* - 2010. - № 25(2). - P. 141-151; MTHFR 677C T and 1298A C Gene Polymorphisms and Its Relation to Levels of Homocysteine, Folate Vitamin B12 and Vitamin B2 In Colorectal Cancer Austral / S. Chandy, M.N. Sadananda Adiga, G. Ramesh et al. // *Asian Journal of Cancer.* - 2010, April. - Vol. 9, № 2. - P. 89-98] та нейрокогнітивних розладів [Association between genetic and environmental factors and the risk of Alzheimer's disease / M. Styczyska, J.B. Strosznajder, D. Religa et al. // *Folia Neuropathol.* - 2008. - № 46(4). - P. 249-254; No Association of Functional Polymorphisms in Methylenetetrahydrofolate Reductase and the Risk and Minor Physical Anomalies of Schizophrenia in Korean Population / Su-Gyeong Kim, Joo Yun Song, Eun-Jeong Joo et al. // *J. Korean. Med. Sci.* - 2011. - Vol. 26. - P. 1356-1363].

На жаль, даних щодо асоціації поліморфізмів і в C677T та A1298C гена MTHFR з ішемічним атеротромботичним інсультом обмаль і вони суперечливі. Таким чином, визначення поліморфізмів C677T та A1298C гена MTHFR дає можливість прогнозувати розвиток ІАТІ до клінічних проявів цієї хвороби та ранньої профілактики у пацієнтів із різними факторами ризику атеросклерозу (стать, артеріальна гіпертензія, паління, ожиріння, гіперкоагуляція крові, цукровий діабет та дисліпідемія атерогенного характеру).

За прототип корисної моделі вибраний спосіб прогнозування виникнення ішемічного інсульту у групах високого ризику [Ischemic stroke in Ukrainian population: possible involvement of the F2 G20210A, F5 G1691A and MTHFR C677T gene variants / P.F. Tatarskyu, A.M. Kucherenko, S.A. Kravchenko et al. // *Biopolymers and Cell.* - 2010. - Vol. 26, № 4. - P. 299-305], при якому прогнозування ішемічного інсульту проводиться на підставі визначення генотипу за C677T поліморфізмом гена MTHFR.

Недоліком зазначеного прототипу є недостатня ефективність прогнозування розвитку ІАТІ, оскільки було враховано лише один поліморфізм C677T гена MTHFR, що впливає на рівень гомоцистеїну в плазмі крові.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення способу прогнозування виникнення ІАТІ у популяції з урахуванням поліморфізмів C677T та A1298C гена MTHFR, що впливають на рівень гомоцистеїну в плазмі крові. Це дозволяє підвищити прогностичну цінність на основі об'єктивних даних при виявленні носійства мінорного алеля за двома поліморфізмами гена, що дає можливість контролювати модифіковані фактори ризику серцево-судинних захворювань, проводити профілактичні заходи, що дозволить суттєво знизити ризик розвитку ІАТІ.

Поставлена задача вирішується тим, що проведення молекулярно-генетичного дослідження поліморфних варіантів С677Т та А1298С гена МТНFR і при наявності мінорного алеля за відповідними поліморфізмами гена МТНFR роблять висновок про зростання ризику ішемічного атеротромботичного інсульту.

5 Спосіб здійснюється таким чином: виконується забір біологічного матеріалу та проводиться молекулярно-генетичне дослідження поліморфних варіантів зазначеного гену. Як матеріал для аналізу використовують венозну кров. Виділення геномної ДНК проводиться з використанням комерційного набору "Diatom DNA Prep 100" (ООО "Лабораторія "Ізоген", Росія).

10 Генотипування за С677Т (rs1801133) та А1298С (rs1801131) поліморфними варіантами гена МТНFR проводили за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції в термоциклері GeneAmp PCR System 2700 ("Applied Biosystems", США).

15 Праймери для PCR синтезовано фірмою "Metabion" (Німеччина), рестриктази фірмою "Thermo Scientific" (США). Для вивчення С677Т поліморфізму використовували праймери: прямий (sense) - 5' GTCATCCCTATTGGCAGGTTAC3' і зворотній (antisense) 5' CTGAGAGGAGATCTGGGAAGAA 3', рестриктазу HinfI; для дослідження А1298С поліморфних варіантів праймери: прямий (sense) 5' GCAAGTCCCCAAGGAGG 3' і зворотній (antisense) 5' GGGTCCCCACTCCAGCATC 3', рестриктазу MbolI. Аналіз довжини рестрикційних фрагментів проводили методом горизонтального електрофорезу в 2,5 % агарозному гелі (Sigma-Aldrich, США). Візуалізацію результатів здійснювали в ультрафіолетових променях за допомогою автоматичної системи відеозчитування "Vi-Tran" в транслюмінаторі ("Біоком", Росія).

20 Наявність у 677-й позиції гена МТНFR цитозину перешкоджає рестрикції, а при його заміні на тимін рестриктаза розщеплює ампліфіковану ділянку (довжина 334 пари азотистих основ) на два фрагменти 241 і 93 пари основ.

25 Щодо А1298С поліморфізму гена МТНFR, то ампліфікат складався із 145 пар нуклеотидів (п. н.). Генотип АА ідентифікувався на електрофореграмі фрагментами 29, 37, 79 п. н., генотип АС 29, 37, 79, 108 п. н., СС 37, 108 п. н.

30 Запропонованим способом було проведено обстеження 170 хворих на ІАТІ (42,4 % жінок і 57,6 % чоловіків) віком від 40 до 85 років (середній вік становив 64,7±0,73 роки) (згідно з рекомендаціями експертів ВООЗ, а також відповідно до рекомендацій європейського та американського товариств кардіологів за результатами детального клініко-інструментального обстеження) та 124 осіб контрольної групи (36,3 % жінок і 63,7 % чоловіків), середній вік 76,7 і 0,93 роки.

35 Статистичний аналіз проводили за допомогою використання програми SPSS-17. Перевірку різниці розподілу генотипів здійснювали за допомогою χ^2 -критерію Пірсона. Значення $P < 0,05$ вважали статистично значущими. Для прогнозування ризику розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту у носіїв мінорного алеля було використано метод логістичної регресії ($P < 0,05$ статистична значущість; OR - відношення ризику).

Результати молекулярно-генетичного аналізу поліморфізмів С677Т та А1298С гена МТНFR у досліджуваних групах пацієнтів подано в таблиці 1.

Таблиця 1

Розподіл генотипів за С677Т та А1298С
поліморфізмами гена МТНFR у контрольній групі і у хворих з ІАТІ

	Контрольна група	Група хворих з ІАТІ
С677Т поліморфізм		
Гомозиготи С/С, n (%)	57 (46,0)	89 (52,3)
Гетерозиготи С/Т, n (%)	60 (48,4)	61 (35,9)
Гомозиготи Т/Т, n (%)	7 (5,6)	20 (11,8)
χ^2	3	3,37
P	> 0,05	> 0,05
А1298С поліморфізм		
Гомозиготи А/А, n (%)	57 (46,0)	72 (42,4)
Гетерозиготи А/С, n (%)	55 (44,3)	63 (37,0)
Гомозиготи С/С, n (%)	12 (9,7)	35 (20,6)
χ^2	0,06	8,38
P	> 0,05	> 0,05

Примітка. Подано частоту генотипу в абсолютних одиницях і відсотках. P - статистична значущість відмінностей між порівнюваними групами за χ^2 -критерієм Пірсона

Методом логістичної регресії доведено, що особи чоловічої статі з генотипом С/Т за С677Т поліморфізмом гена МТНFR у 2,3 раза стійкіші до ІАТІ, ніж з генотипом С/С (P=0,010; OR=0,433). У чоловіків-гомозигот за мінорним алелем (С/С) за А1298С поліморфізмом ризик розвитку ІАТІ в 3,5 раза вищий, ніж у носіїв генотипу А/А (P=0,016; OR=3,474).

Технічним результатом, що досягається запропонованим способом, є прогнозування виникнення ішемічного атеротромботичного інсульту в осіб, які мають Т/Т та С/С генотипи за вивченими поліморфізмами гена МТНFR. Це дозволить сформувати групу ризику щодо розвитку ІАТІ. Таким пацієнтам бажано рекомендувати контролювання модифікованих факторів ризику серцево-судинних захворювань, проведення профілактичних заходів, що дозволить суттєво знизити ризик розвитку ІАТІ. Запропонований нами спосіб є інформативним та проводиться один раз за життя пацієнта.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозування виникнення ішемічного атеротромботичного інсульту (ІАТІ) з урахуванням поліморфізмів гена метилентетрагідрофолатредуктази (МТНFR), що включає визначення С677Т поліморфізму гена МТНFR, який **відрізняється** тим, що додатково індивідуально визначають А1298С поліморфізм гена МТНFR і при наявності носійства мінорного алеля за двома поліморфізмами С677Т та А1298С гена МТНFR роблять висновок про зростання ризику розвитку ІАТІ.

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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