



МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118841** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/50 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2017 02848	(72) Винахідник(и): Олешко Тетяна Богданівна (UA), Гарбузова Вікторія Юріївна (UA), Дубовик Євген Іванович (UA), Атаман Олександр Васильович (UA)
(22) Дата подання заявки: 27.03.2017	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 28.08.2017	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 28.08.2017, Бюл.№ 16	(73) Власник(и): СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, 40007 (UA)

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ РОЗВИТКУ ІШЕМІЧНОГО АТЕРОТРОМБОТИЧНОГО ІНСУЛЬТУ

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту включає виділення геномної ДНК з периферійної венозної крові з наступним виявленням даних про наявність поліморфізму гена EDN1 та його урахуванням. При цьому при виявленні поліморфізму гена EDN1 визначають поліморфний варіант Lys198Asn гена EDN1 і при наявності мінорного алеля за поліморфізмом Lys198Asn гена EDN1 прогнозують підвищений ризик виникнення у цих хворих ішемічного атеротромботичного інсульту.

UA 118841 U

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

Серцево-судинні захворювання, а особливо порушення мозкового кровообігу ішемічного типу, є однією з провідних причин захворюваності та смертності у всьому світі, а також інвалідизації значної частини працездатного населення. Тому питання профілактики та лікування судинних захворювань нервової системи мають не лише медичне, а й велике соціальне значення. Захворюваність на мозковий інсульт у нашій країні суттєво перевищує аналогічні показники в розвинутих країнах світу. Аналіз динаміки захворюваності на інсульт свідчить про несприятливу тенденцію до її зростання. Достовірно відомо, що провідну роль у патогенезі ішемічного інсульту займає дисфункція ендотелію (ДЕ) [Rajendran P. The Vascular Endothelium and Human Diseases/ P. Rajendran, T. Rengarajan, J. Thangavel et al.// Int. J. Biol. Sci. - 2013. - Vol. 9 (10). - P. 1057-1069; Турлюн Т.С. Изменение функционального состояния эндотелия под влиянием проводимой антигипертензивной терапии у пациентов с артериальной гипертензией и высоким кардиоваскулярным риском/ Т.С. Турлюн// Медицинские перспективы. - 2014. - № XIX (1). - С. 56-63]. Фактори ризику судинних захворювань порушують баланс ендотеліальних судинних агентів, що в подальшому реалізується в ініціюванні і прогресуванні патологічних змін судин, в тому числі церебральних. ДЕ може бути самостійною причиною порушення кровообігу, оскільки провокує ангіоспазм чи тромбоз судин, а з іншого боку порушення регіонарного кровообігу (наприклад ішемія) можуть призводити до ендотеліальної дисфункції [Бокерия Л.А. Эндотелиальная дисфункция в патогенезе расстройств мозгового кровообращения при фибрилляции предсердий/ Л.А. Бокерия, В.Ю. Таскина// Клиническая физиология кровообращения. - 2013. - № 3. - С. 46-56]. Ендотеліальна дисфункція сприяє розвитку атеросклерозу та атеротромбозу, підвищенню агрегаційної здатності моноцитів та тромбоцитів, модуляції гіперкоагуляції та порушенню вмісту ліпопротеїдів низької щільності [Мищенко Т.С. Факторы риска и клинические особенности у больных с различными подтипами ишемического инсульта/ Т.С. Мищенко, Н.В. Овсянникова, В.В. Лебединец// Международный медицинский журнал. - 2011. - № 3. - С. 27-32]. Зважаючи на це ДЕ вважають ранньою патофізіологічною ознакою і предиктором судинної патології та ішемічного інсульту.

У хворих з церебральним ішемічним інсультом відбувається порушення балансу в системі факторів ендотеліальної вазорегуляції - оксиду азоту та ендотеліну-1 (EDN1), що свідчить про ендотеліозалежні механізми розвитку даного захворювання. Підвищення плазмової концентрації ендотеліну-1 є маркером гострого церебрального інфаркту [Edvinsson L. Cerebrovascular endothelin receptor upregulation in cerebral ischemia/ L. Edvinsson// Current Vascular Pharmacology. - 2009. - Vol. 7. - P. 26-33].

Існує велика кількість підтверджень впливу генетичних факторів на механізми, що причетні до порушень метаболізму та уражень судинної стінки. Одним з таких методів є дослідження ролі однонуклеотидних поліморфізмів генів, що кодують ключові патогенетичні механізми розвитку захворювання. Таким чином, враховуючи переваги та недоліки сучасних методів діагностики та профілактики цереброваскулярних захворювань, питання оптимізації та удосконалення методик прогнозування з метою попередження ІАТІ є актуальною та остаточно не вирішеною проблемою сучасної науки.

За прототип корисної моделі вибрано спосіб прогнозування виникнення ішемічного інсульту з урахуванням генотипу [Effect of SNP polymorphisms of EDN1, EDNRA, and EDNRB gene on ischemic stroke/ L. Zhang, R. Sui// Cell Biochem Biophys. - 2014. - Vol. 70. - P. 233-239], при якому ризик розвитку інсульту оцінювали на підставі визначення генотипу за поліморфізмами гена EDN1 та генів рецепторів до ендотеліну типу А і Б.

Зважаючи на те, що ключову роль в прогнозуванні патології судин відіграє EDN1, недоліком даного методу є використання трьох маркерів для дослідження, що робить його більш тривалим та громіздким. Зважаючи на економічну ситуацію в нашій країні, використання двох необов'язкових складових є фінансово недоцільним.

В основу корисної моделі поставлено задачу:

спрощення методики з використанням лише одного маркера EDN1, без втрати ефективності;

скорочення тривалості періоду прогнозування;

удосконалення існуючого методу з метою отримання фінансово доцільного, уніфікованого та водночас ефективного методу прогнозування розвитку ІАТІ у популяції з урахуванням поліморфізму гена EDN1, що впливає на рівень ендотеліну-1.

На основі отриманих об'єктивних даних про наявність носійства мінорного алеля за даним поліморфізмом можна підвищити прогностичну цінність на ранніх етапах розвитку

ендотеліальної дисфункції, покращити діагностику, раніше виявляти необхідність проведення профілактичних заходів, що дозволить впливати на модифіковані фактори ризику цереброваскулярних захворювань, а також суттєво знизити ризик розвитку ІАТІ. Важливою перевагою запропонованого нами способу є значна інформативність та відсутність необхідності проведення повторних досліджень, адже проводиться один раз за життя пацієнта.

Поставлена задача вирішується шляхом виділення геномної ДНК з периферійної венозної крові з наступним виявленням даних про наявність поліморфізму гена EDN1 та його урахуванням, де згідно із корисною моделлю, при виявленні поліморфізму гена EDN1 визначають поліморфний варіант Lys198Asn гена EDN1 і при наявності мінорного алеля за поліморфізмом цього гена прогнозують підвищений ризик виникнення ішемічного атеротромботичного інсульту.

Використання запропонованого способу з усіма суттєвими ознаками, включаючи відмінні, дозволяє суттєво знизити ризик розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту, вирішуючи тим самим поставлену технічну задачу.

Спосіб здійснюється наступним чином. Матеріалом для аналізу слугує венозна кров. Після забору біологічного матеріалу проводиться виділення геномної ДНК з використанням комерційного набору "Diatom DNA Prep 100" (ООО "Лабораторія "Ізоген", Росія) з наступним молекулярно-генетичним дослідженням поліморфних варіантів зазначеного гена.

Визначення Lys198Asn поліморфізму 5-го екзону гена EDN1 проводиться за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції з подальшим аналізом довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP) у термоциклері GeneAmp PCR System 2700 ("Applied Biosystems", США). Ділянку зазначеного гена ампліфікували за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (sense) - 5' TCTTGCTTTATTAGGTCGGAGACC 3' і зворотного (antisense) - 5' TTTGAACGAGGACGCTGGTC 3' ("Metabion", Німеччина). Для рестрикційного аналізу використовується рестриктаза Cac81 ("Thermo Scientific", США). Після рестрикції ампліфікати вивченого фрагмента гена EDN1 розділяють в 2,5 % агарозному гелі, що містить 10 мкг/мл бромистого етидію. Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснюють за допомогою транслюмінатора ("Біоком", Росія).

Якщо, при дослідженні Lys198Asn поліморфізму, у 5665-й позиції гена EDN1 містився гуанін, ампліфікат, який складався із 262 пар основ, розщеплювався рестриктазою Cac81 на два фрагменти - 189 і 73 пари основ, візуалізація яких за допомогою електрофорезу в агарозному гелі дає підстави зробити висновок про Lys/Lys - генотип. У разі заміни гуаніну на тимін сайт рестрикції для Cac81 втрачався і утворювався один фрагмент розміром 262 пари основ (Asn/Asn - генотип). Наявність фрагментів довжиною 262, 189 і 73 пари основ відповідає Lys/Asn генотипу.

За допомогою запропонованого способу проведено обстеження 170 хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом та 124 особи без ознак серцево-судинної патології, що склали контрольну групу.

Статистичний аналіз проводили з використанням програми SPSS-17. Перевірку різниці розподілу генотипів здійснювали за допомогою χ^2 -критерію Пірсона. Значення $P < 0,05$ вважали статистично достовірними. Для прогнозування ризику виникнення ІАТІ у носіїв мінорного алеля використовували метод логістичної регресії ($P < 0,05$ - статистична значущість; OR - відношення ризику).

Завдяки проведеному генотипуванню хворих з ІАТІ та осіб контрольної групи за Lys198Asn поліморфізмом гена EDN1 були отримані результати, що наведені в таблиці.

Таблиця

Частота алельних варіантів за Lys198Asn поліморфізмом гена EDN1 у контрольній групі та у хворих з ІАТІ

Генотип	Контроль, n (%)	Хворі з ІАТІ, n (%)
Lys/Lys	79 (63,7)	82 (48,2)
Lys/Asn	40 (32,3)	67 (39,4)
Asn/Asn	5 (4,0)	21 (12,4)
χ^2	9,757	
P	0,008	

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

Використання методу логістичної регресії дозволило доказати зв'язок досліджуваного генетичного маркера та ішемічного атеротромботичного інсульту. Встановлено, що у осіб які є гомозиготами за мінорним алелем ризик розвитку ІАТІ більший у 4 рази ($P=0,007$; $OR=4,046$).

- 5 Технічний результат, який досягається при здійсненні корисної моделі, полягає у прогнозуванні ризику розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту в осіб, що є носіями Asn/Asn генотипу за Lys198Asn поліморфізмом гена EDN1. Отримані дані дозволяють виявляти осіб, генетично схильних до інсульту, проводити ранню діагностику дисфункції ендотелію судин та сформувати групу ризику ІАТІ. Рекомендації таким особам повинні включати контроль
- 10 модифікованих факторів ризику цереброваскулярних захворювань, застосування профілактики ішемії мозку, що суттєво знизить ризик розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 15 Спосіб прогнозування розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту, що включає виділення геномної ДНК з периферійної венозної крові з наступним виявленням даних про наявність поліморфізму гена EDN1 та його урахуванням, який **відрізняється** тим, що при виявленні поліморфізму гена EDN1 визначають поліморфний варіант Lys198Asn гена EDN1 і при наявності мінорного алеля за поліморфізмом Lys198Asn гена EDN1 прогнозують підвищений
- 20 ризик виникнення у цих хворих ішемічного атеротромботичного інсульту.

Комп'ютерна верстка О. Рябко

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

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