



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **111586** (13) **U**  
(51) МПК  
**G01N 33/50** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<p>(21) Номер заявки: <b>u 2016 06199</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>07.06.2016</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>10.11.2016</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.11.2016, Бюл.№ 21</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Розуменко Інна Олександрівна (UA), Гарбузова Вікторія Юріївна (UA), Матлай Ольга Іванівна (UA), Обухова Ольга Анатоліївна (UA), Атаман Олександр Васильович (UA)</b></p> <p>(73) Власник(и): <b>СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, 40007 (UA)</b></p>
--	--

**(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ВИНИКНЕННЯ ГОСТРОГО КОРОНАРНОГО СИНДРОМУ З УРАХУВАННЯМ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНІВ ІНГІБІТОРІВ ТА АКТИВАТОРІВ ЕКТОПІЧНОЇ КАЛЬЦИФІКАЦІЇ**

**(57) Реферат:**

Спосіб прогнозування розвитку гострого коронарного синдрому з урахуванням поліморфізму генів інгібіторів та активаторів ектопічної кальцифікації включає визначення K121Q поліморфізму гена ENPP1. Додатково індивідуально визначають T134967G поліморфізм гена ANKH та A69314G поліморфізм гена TNAP. При наявності мінорного алеля за поліморфізмами T134967G гена ANKH та A69314G гена TNAP роблять висновок про зростання ризику розвитку гострого коронарного синдрому.

**UA 111586 U**



Корисна модель належить до галузі клінічної та теоретичної медицини, а саме до внутрішніх хвороб, кардіології, патофізіології та медичної генетики, і може бути використана з метою прогнозування та профілактики гострого коронарного синдрому (ГКС).

Вивчення захворювань серцево-судинної системи було й залишається одним із найактуальніших питань сучасної теоретичної та практичної медицини. Прикра статистика свідчить, що сьогодні Україна посідає перше місце серед країн Європи за рівнем смертності від хвороб серця та судин. Патофізіологічною основою більшості серцево-судинних хвороб є атеросклеротичний процес [Ischemic Heart Disease. 130 Questions & Answers / R. Ferrari, M. Lettino, C. Cecconi et al. - 2-nd Edition. - Paris : Fransa Servier, 2006. - 305 p.]. Одним із найтяжчих ускладнень атеросклерозу вважають гострий коронарний синдром (ГКС) - період вираженого загострення ішемічної хвороби серця, до якого відносять такі нозологічні одиниці, як нестабільну стенокардію, дрібновогнищевий (без зубця Q) інфаркт міокарда, великовогнищевий (із зубцем Q) інфаркт міокарда та раптову коронарну смерть [Пархоменко А.Н. Новые аспекты патогенеза и лечения больных с нестабильной стенокардией и мелкоочаговым инфарктом миокарда / А.Н. Пархоменко, Я.М. Лутай// Український медичний часопис. - 2000. - № 4. - С. 17-26; Атаман О.В. Патофізіологія : підручник : в 2 т. Т. 2. Патофізіологія органів і систем/ О.В. Атаман. - Вінниця : Нова книга, 2016. - 444 с]. Кальцифікація атеросклеротичної бляшки є одним із несприятливих ускладнень, що призводить до звуження просвіту артерії та розвитку критичної ішемії серця і дестабілізації бляшки. Саме нестабільність бляшки в коронарних артеріях спричиняє розвиток прогресуючої нестабільної стенокардії та інфаркту міокарда [Талаева Т.В. Сосудистая кальцификация: реальность и гипотезы/ Т.В. Талаева, В.В. Братусь// Здоров'я України. Кардіологія. Наука - практиці. - 2014, лютий. - С. 56-60.].

Відомо, що розвиток кальцифікації судин відбувається за умов порушення балансу між факторами - активаторами та інгібіторами - відкладення кристалів кальцію в судинній стінці. До основних чинників, що захищають судинну стінку від звапніння, належить неорганічний пірофосфат (PPi). Антикальциногенна дія PPi у тканинах пов'язана з пригніченням росту кристалів оксіапатиту за рахунок його хелатороподібної дії, гальмуванням трансдиференціювання гладком'язових клітин у хондроцити, активацією остеопонтину [Towler D. A. Inorganic Pyrophosphate. A Paracrine Regulator of Vascular Calcification and Smooth Muscle Phenotype / D. A. Towler // Arterioscler Thromb Vase Biol. - 2005. - Vol. 25. - P. 651-654.]. Кількість PPi у судинній стінці визначається дією 3 основних ферментів: два з яких - ENPP1 (ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family 1) та ANKH (inorganic pyrophosphate transport regulator) - забезпечують підвищення концентрації PPi й захищають судинну стінку від кальцифікації, третій -TNAP (tissue non-specific alkaline phosphatase) сприяє кальцифікації шляхом гідролізу PPi [Identification of new microRNAs targeting genes regulating the Pi/PPi balance in chondrocytes / T. Clement, V. Salone, B. Charpentier et al. // Bio-medical materials and engineering. - 2014. - Vol. 24. - P. 3-16; The functional co-operativity of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) and PHOSPHO1 during initiation of skeletal mineralization / C Huesa, D. Houston, T. Kiffer-Moreira et al. // Biochemistry and biophysics reports. - 2015. - Vol. 4. - P. 196-201; Abnormal Mechanical Loading Induces Cartilage Degeneration by Accelerating Meniscus Hypertrophy and Mineralization After ACL Injuries In Vivo / G. Du, H. Zhan, D. Ding et al. // Am. J. Sports Med. - 2016. - DOI : 10.1177/0363546515621285.].

Активність цих ферментів може залежати від багатьох факторів, зокрема й від структури генів, що кодують відповідні білки. Доведено, що порушення утворення або посилення гідролізу PPi можуть бути зумовлені генетичними аномаліями.

Незважаючи на значну кількість праць, присвячених ролі алельного поліморфізму генів у розвитку атеросклерозу та його ускладнень, дані про значення антикальциногенних маркерів, серед яких PPi, нечисленні й суперечливі. Таким чином, визначення поліморфізмів K121Q гена ENPP1, T134967G гена ANKH і A69314G гена TNAP дає можливість прогнозувати розвиток ГКС 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 більшості серцево-судинних захворювань (ССЗ) у групах високого ризику [The ENPP1 Q121 Variant Predicts Major Cardiovascular Events in High-Risk Individuals / S. Bacci, S. Rizza, S. Prudente et. al // Diabetes. - 2001. - Vol. 60. - P. 1000-1007.], при якому прогнозування більшості серцево-судинних подій проводиться на підставі визначення генотипу за K121Q поліморфізмом гена ENPP1.

Недоліком зазначеного прототипу є недостатня ефективність прогнозування розвитку ССЗ, у тому числі й ГКС, оскільки було враховано поліморфізм лише одного гена (K121Q гена ENPP1), що захищає судинну стінку від кальцифікації.

В основу даної корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу прогнозування виникнення ГКС у популяції з урахуванням поліморфізму генів інгібіторів (K121Q поліморфізм гена ENPP1 і T134967G поліморфізм гена ANKH) та активаторів (A69314G поліморфізм гена TNAP) ектопічної кальцифікації, що впливають на рівень позаклітинного неорганічного пірофосфату. Це дозволяє підвищити прогностичну цінність на основі об'єктивних даних при виявленні носійства мінорного алеля за поліморфізмами трьох генів, що дає можливість контролювати модифіковані фактори ризику серцево-судинних захворювань, проводити профілактичні заходи, що дозволить суттєво знизити ризик розвитку ГКС.

Поставлена задача вирішується за допомогою проведення молекулярно-генетичного дослідження поліморфних варіантів K121Q гена ENPP1, T134967G гена ANKH та A69314G гена TNAP і при наявності мінорного алеля за відповідними поліморфізмами генів ANKH та TNAP роблять висновок про зростання ризику гострого коронарного синдрому.

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

Визначення алельного K121Q поліморфізму 4-го екзону гена ENPP1, A69314G поліморфізму 9-го екзону гена TNAP та T134967G поліморфізму 8-го інтрону гена ANKH проводиться методом полімеразної ланцюгової реакції з подальшим аналізом довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP) у термоциклері GeneAmp PCR System 2700 («Applied Biosystems», США).

Для проведення PCR використовуються пари специфічних праймерів («Metabion», Німеччина): для K121Q поліморфізму гена ENPP1 - прямий (sense) 5' CTGTGTTCACTTTGGACATGTTG 3' і зворотний (antisense) - 5' GACGCTGGAAGATAACCAGGCTG 3'; для A69314G поліморфізму гена TNAP - прямий (sense) 5' CCTAATTCTGGGCCACAAA 3' і зворотний (antisense) - 5' CCTTCCACCAGCAAGAAGAA 3'; для T134967G поліморфізму гена ANKH - прямий (sense) 5' AACCTTCTCCTTTCTGCAGC 3' і зворотний (antisense) - 5' CCAGAATAACCCAGCAACA 3'. Для рестрикційного аналізу використовуються рестриктази («Thermo Scientific», США): для K121Q поліморфізму - рестриктаза Eco47I (Avall); для A69314G поліморфізму - BcnI (Neil); для A69314G поліморфізму – Hin6I (HinP1I). Ампліфікати вивчених фрагментів досліджуваних генів розділяли в 2,5 % агарозному гелі, що містив 10 мкг/мл бромистого етидію. Візуалізація ДНК після електрофорезу здійснюється за допомогою трансільюмінатора («Біоком», Росія).

При дослідженні K121Q поліморфізму гена ENPP1 наявність фрагмента ДНК розміром 238 пар основ (п.о.) відповідає K/K генотипу, наявність трьох фрагментів довжиною 238 п.о., 148 п.о. і 90 п.о. - K/Q генотипу, а наявність фрагментів довжиною 148 п.о. і 90 п.о. - генотипу Q/Q. Наявність у 69314-й позиції гена TNAP аденіну перешкоджає рестрикції, а при заміні аденіну на гуанін рестриктаза BcnI (Ncil) розщеплює ампліфіковану ділянку (довжина - 308 п.о. - A/A генотип) на два фрагменти: 185 і 123 (G/G генотип) п.о.; наявність фрагментів довжиною 308 п.о., 185 п.о. і 123 п.о. - генотипу A/G. Наявність у 134967-й позиції гена ANKH тиміну перешкоджає рестрикції, а при заміні тиміну на гуанін рестриктаза Hin6I (HinP1I) розщеплює ампліфіковану ділянку (довжина - 350 п.о. - T/T генотип) на два фрагменти: 235 і 115 п.о. (G/G генотип); наявність фрагментів довжиною 350 п.о., 235 п.о. і 115 п.о. відповідає T/G генотипу.

Запропонованим способом було проведено обстеження 118 хворих із ГКС (згідно з рекомендаціями експертів ВООЗ, а також відповідно до рекомендацій європейського та американського товариств кардіологів за результатами детального клініко-інструментального обстеження) та ПО осіб контрольної групи.

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

Результати молекулярно-генетичного аналізу поліморфізмів K121Q гена ENPP1, T134967G гена ANKH та A69314G гена TNAP у досліджуваних групах пацієнтів подано в таблиці.

Розподіл генотипів за K121Q поліморфізмом гена ENPP1, T134967G поліморфізмом гена ANKH та A69314G поліморфізмом гена TNAP у контрольній групі та у хворих із ГКС

	Ген ENPP1		Ген ANKH		Ген TNAP	
	K/K	K/Q+Q/Q	T/T	T/G+G/G	A/A	T/G+G/G
Контроль, n (%)	83 (75,5 %)	27 (24,5 %)	74 (67,3 %)	36 (32,7 %)	92 (83,6 %)	18 (16,4%)
Хворі з ГКС, n (%)	79 (67,0 %)	39 (33,0 %)	62 (52,5 %)	56 (47,5 %)	82 (69,5 %)	36 (30,5 %)
$\chi^2$	2,002		5,132		6,302	
P	0,157		0,023		0,012	

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

5 Методом логістичної регресії доведено, що ризик виникнення ГКС в осіб, які були носіями мінорного алеля T/G+G/G за T134967G поліморфізмом гена ANKH майже в 1,9 разу вищий, ніж у гомозигот за основним алелем T/T (P=0,024; OR=1,857); у носіїв мінорного алеля A/G+G/G за A69314G поліморфізмом гена TNAP - у 2,24 разу вищий, ніж у гомозигот за основним алелем A/A (P=0,013; OR=2,244).

10 Технічним результатом, що досягається запропонованим способом, є прогнозування ризику розвитку гострого коронарного синдрому в осіб, які мають T/G і G/G генотипи за T134967G поліморфізмом гена ANKH та A/G і G/G генотипи за A69314G поліморфізмом гена TNAP. Це дозволяє сформувати групу ризику щодо розвитку ГКС. Таким пацієнтам бажано рекомендувати контролювання модифікованих факторів ризику серцево-судинних захворювань, проведення профілактичних заходів, що дозволить суттєво знизити ризик розвитку ГКС. Запропонований нами спосіб є інформативним та проводиться один раз за життя пацієнта.

15

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

20 Спосіб прогнозування розвитку гострого коронарного синдрому з урахуванням поліморфізму генів інгібіторів та активаторів ектопічної кальцифікації, що включає визначення K121Q поліморфізму гена ENPP1, який **відрізняється** тим, що додатково індивідуально визначають T134967G поліморфізм гена ANKH та A69314G поліморфізм гена TNAP і при наявності мінорного алеля за поліморфізмами T134967G гена ANKH та A69314G гена TNAP роблять висновок про зростання ризику розвитку гострого коронарного синдрому.