



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК

C12N15/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: по данным на 27.01.2015 - действует

Пошлина: учтена за 8 год с 04.04.2014 по 03.04.2015

(21), (22) Заявка: 2007112316/13, 03.04.2007

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
03.04.2007

(43) Дата публикации заявки: 10.10.2008

(45) Опубликовано: [20.12.2009](#)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: GLOTOV A.S. et al. Renin-angiotensin and kinin-bradykinin genes polymorphism effects on permanent arterial hypertension in children, Mol. Biol. (Mosk), 2007, v.41, n.1, p.18-25. WO 2006110601, 19.10.2006. RU 2185442 C2, 20.07.2002.

Адрес для переписки:
634050, г.Томск, Наб. Ушайки, 10, ГУ НИИ
медицинской генетики

(72) Автор(ы):

Гончарова Ирина Александровна (RU),
Макеева Оксана Алексеевна (RU),
Минайчева Лариса Ивановна (RU),
Пузырев Валерий Павлович (RU),
Степанов Вадим Анатольевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное учреждение Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук (RU),
Общество с ограниченной ответственностью "Геномная диагностика" (RU)

(54) СПОСОБ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ПОДВЕРЖЕННОСТИ К СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано для диагностики наследственной предрасположенности к **сердечно-сосудистым** заболеваниям у человека. Способ основан на определении генотипов по полиморфным вариантам A166C гена AGTR1, A-240T и A2350G гена ACE, C677T гена MTHFR, T174M гена AGT, C825T гена GNB3, VNTR4a/b и G894T гена NOS3, G1691A гена F5, PLA1/A2 гена ITGB3, G20210A гена F2 и оценке риска путем суммирования количества баллов, присвоенных каждому генотипу. При этом генотипам «низкого» риска **сердечно-сосудистой** патологии присваивается 0 баллов, к ним относятся генотипы 1166AA гена AGTR1, -240AA, 2350AA гена ACE, 677CC гена MTHFR, 174TT гена AGT, 825CC гена GNB3, VNTR4bb и 894GG гена NOS3, 1691GG гена F5, PLA1/A1 гена ITGB3, 20210GG гена F2. Генотипам «среднего» риска присваивается 0,5 баллов, к

ним относятся генотипы 1166AC гена AGTR1, -240AT и 2350AG гена ACE, 677CT гена MTHFR, 174TM гена AGT, 825CT гена GNB3, VNTR4ab и 894GT гена NOS3. Генотипам «высокого» риска присваивается 1 балл, к ним относятся генотипы 1166CC гена AGTR1, -240TT и 2350GG гена ACE, 677TT гена MTHFR, 174MM гена AGT, 825TT гена GNB3, VNTR4aa и 894GT гена NOS3, 1691GA и 1691AA гена F5, PLA1/A2 и PLA2/A2 гена ITGB3, 20210GA и 20210AA гена F2. Риск **сердечно-сосудистых** болезней считается «низким» при сумме баллов от 0 до 3, средним - от 3,5 до 6, высоким - от 6,5 до 11 баллов. Изобретение позволяет увеличить точность генетической диагностики и учитывает взаимосвязь патогенеза большинства **сердечно-сосудистых** заболеваний. 8 табл.

Изобретение относится к молекулярной биологии и медицине и может быть использовано для диагностики (в том числе предиктивной) наследственной предрасположенности к **сердечно-сосудистым** заболеваниям (ССЗ) у человека.

Сердечно-сосудистые болезни занимают одно из первых мест в структуре смертности в большинстве стран, в том числе в России - 55% от общего числа умерших (Статистические материалы Минздрава России, 2003). Ранняя диагностика позволяет осуществлять эффективные профилактические мероприятия, а своевременное начало лечения способствует сохранению трудоспособности и профилактике осложнений - необратимого повреждения органов-мишеней (сердца, почек, сосудов). Хорошо изучены факторы риска **сердечно-сосудистых** заболеваний, к которым относятся высокий уровень артериального давления крови, пожилой возраст, избыток массы тела, фактор курения, сахарный диабет, принадлежность к мужскому полу и др. Разработаны клинические и биохимические маркеры повышенного риска **сердечно-сосудистых** заболеваний: высокий уровень общего холестерина и холестерина липопротеидов низкой плотности, низкий уровень холестерина липопротеидов высокой плотности, высокий уровень глюкозы сыворотки крови и др. В настоящее время риск ССЗ оценивается по данным клинико-инструментальных методов (измерение уровня артериального давления крови, эхо- и электрокардиография, ангиография и т.д.), биохимических показателей (липидный спектр крови, уровень глюкозы крови), с учетом воздействия вредных внешне-средовых факторов (курение, диета, богатая жирами и солью). В то же время вклад наследственности в формирование ССЗ составляет 50-70%. Однако пока не разработаны надежные методы индивидуальной оценки «генетического» риска ССЗ, хотя описано и подробно изучено несколько десятков генов-кандидатов различных ССЗ.

Существующие на сегодня аналоги включают, как правило, небольшое количество генетических маркеров или предназначены для расчета риска отдельных **сердечно-сосудистых** заболеваний. В частности, известная международная коммерческая сеть, объединяющая европейские генетические лаборатории - GENDIA (www.v.gendia.net), предлагает тестирование генетических полиморфизмов для определения риска развития различных заболеваний, в том числе **сердечно-сосудистых**. Острый инфаркт миокарда - один ген LTA (полиморфные варианты A252G и C804A); коронарный спазм - ген NOS3 (полиморфный вариант G894T); ишемическая болезнь сердца - ген APOE (полиморфные варианты E2, E3, E4); венозные тромбозы - 4 мутации в трех генах; артериальная гипертензия - гены ACE и NOS3 (по одному полиморфному варианту). В общей сложности предлагается анализ только 10 генов (LTA, AGT, APOE, NOS3, F5, F2, MTHFR, PAII, FI3, ACE). Предлагаемые панели включают малое число полиморфизмов (только антитромботическая панель включает анализ четырех полиморфных вариантов; G1691A в гене F5, G20210A в гене F2, C677T и A1298C в гене MTHFR), во всех остальных случаях предлагается тестирование одного-двух полиморфизмов, чего явно недостаточно для

надежной оценки риска развития заболеваний. Кроме того, почти все существующие аналоги построены на данных, опубликованных в научной литературе, а не на результатах собственных научных исследований, отсутствует информация о возможности применения тест-систем в различных популяциях, в том числе у русских.

Наиболее близким к предлагаемому способу генетической диагностики является метод, предложенный Глотовым, Иващенко, Образцовой и др. (Глотов А.С., Иващенко Т.Э., Образцова Г.И., Наседкина Т.В., Баранов В.С. Зависимость между возникновением стабильной артериальной гипертензии у детей и полиморфизмом генов ренин-ангиотензиновой и кинин-брадикининовой систем. Молекулярная биология, 2007, т.41, № 1, с.18-25) - «кардиочип», включающий семь вариантов генов ренин-ангиотензиновой и кинин-брадикининовой систем, использованный авторами для диагностики стабильной артериальной гипертензии у детей. Недостатком данного набора молекулярно-генетических маркеров является небольшое число вариантов, включенных в анализ: анализируются только полиморфные варианты генов ренин-ангиотензиновой и кинин-брадикининовой систем, тогда как известно множество метаболических цепей, компоненты которых также играют важную роль в формировании **сердечно-сосудистых** заболеваний.

Технической задачей изобретения является разработка панели генетических маркеров и способа расчета риска для улучшения точности диагностики наследственной предрасположенности к **сердечно-сосудистым** заболеваниям с учетом взаимосвязи патогенеза большинства из них.

Техническая задача решается тем, что в предлагаемом способе, как и в прототипе; анализируют гены-кандидаты **сердечно-сосудистых** заболеваний, в том числе ренин-ангиотензиновой и кинин-брадикининовой систем (ACE, AGT, AGTR1), однако в отличие от прототипа анализируют гены эндотелиальной синтазы оксида азота (NOS3), бета-3-субъединицы гуанин-нуклеотид связывающего белка (GNB3), для которых показаны ассоциации с давлением крови и другими важными параметрами **сердечно-сосудистой** системы и заболеваниями (Siffert W., Roskopf D., Siffert G. et al. Association of a human G-protein beta3 subunit variant with hypertension // Nature Genet. 1998. V.18. P.45-18; Schunkert H., Hense H.-W., Döring A. et al. Association between a polymorphism in the G protein β_3 -subunit gene and lower renin and elevated diastolic blood pressure levels // Hypertension. 1998. V. 32. P. 510-513; Beige J., Hohenbleicher H., Distler A., Sharma A.Y. G-protein β_3 subunit C825T variant and ambulatory blood pressure in essential hypertension // Hypertension. 1999. V.33. P.1049-1051; Benjafeld A.V., Jeyasingam C.L., Nyholt D.R. et al. G-protein β_3 subunit gene (GNB3) variant in causation of essential hypertension // Hypertension. 1998. V.32. P.1094-1097; Miyamoto Y., Saito Y., Kajiyama N. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension // Hypertension. 1998. V.32. P.3-8; Jachymova M., Hork K., Bultas J. et al. Association of the Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension resistant to conventional therapy // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001. V.284. P.426-430; Мустафина О.Е., Шагисултанова Е.И., Насибуллин Т.Р. и др. Полиморфизм минисателлита гена эндотелиальной синтазы окиси азота: исследование в популяциях Волго-Уральского региона и анализ ассоциаций с инфарктом миокарда и эссенциальной гипертензией // Генетика. 2001. Т.37. № 5. С.668-674). В прототипе в гене ACE анализируется только один вариант (вставка/отсутствие Alu-элемента), который, по последним данным, возможно, не играет самостоятельного значения (Zhu X.,

Bouzekri N., Southam L., Cooper R. S. et al. Linkage and association analysis of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-gene polymorphisms with ACE concentration and blood pressure // Am. J. Hum. Genet. 2001. V.68. P.1139-1148). Панель дополнена вариантами генов свертывающей системы крови (тромботическая панель) и гена фолатного цикла MTHFR. Кроме того, согласно современным теориям формирования ССЗ, все **сердечно-сосудистые** болезни взаимосвязаны и представляют собой непрерывно развивающуюся цепь событий (теория **сердечно-сосудистого** континуума, Беленков Ю.Н., Мареев В.Ю. **Сердечно-сосудистый** континуум // Сердечная недостаточность. 2002. Т.3. № 1. С.7-11; Пузырев В.П., Макеева О.А., Голубенко М.В. Гены синтропий и **сердечно-сосудистый** континуум // Вестник ВОГиС, 2006, Том 10, № 3, С.479-491). Поэтому необходимо тестировать подверженность к **сердечно-сосудистой** патологии вообще (комплекс взаимосвязанных болезней), а не к одному отдельно взятому заболеванию.

Диагностическая ценность генетических вариантов, используемых в предлагаемом способе генетической диагностики, подтверждена рядом исследований: сведения об ассоциации генетических маркеров с различными **сердечно-сосудистыми** заболеваниями по данным научной литературы и результатам собственных исследований, а также показатели отношения шансов (OR) для **сердечно-сосудистых** заболеваний приведены в табл.1.

В дальнейшем сущность изобретения поясняется описанием и таблицами. Сущность предлагаемого изобретения состоит в анализе любым из известных молекулярно-генетических методов 11 полиморфных вариантов в 9 генах (см. табл.2), имеющих отношение к регуляции сосудистого тонуса и ремоделированию сердца (полиморфные варианты VNTR4a/b и G894T гена NOS3, A-240T и A2350G гена ACE, A1166C гена AGTR1, T174M гена AGT, C825T гена GNB3), обмену гомоцистеина (полиморфный вариант C677T гена MTHFR), свертывающей системе крови (тромботическая панель) вариант G1691A гена F5, G20210A гена F2, PLA1/A2 гена ITGB3 для диагностики подверженности к **сердечно-сосудистым** заболеваниям и оценке риска развития **сердечно-сосудистой** патологии.

Для оценки генетического риска ССЗ был разработан следующий алгоритм. Каждому возможному генотипу в зависимости от того, являются ли он протективным или предрасполагающим к развитию патологии, присваивается балл в соответствии с данными, приведенными в табл.3. Эти данные были получены при анализе групп больных с **сердечно-сосудистыми** заболеваниями и здоровыми жителями г.Томска (проанализировано более 300 случаев), а также анализа опубликованных исследований. Для расчета риска ССЗ суммируются баллы, полученные при молекулярно-генетическом анализе, и риск развития заболевания оценивается как «низкий», «средний» или «высокий».

Апробацию предлагаемого способа проводили несколькими методами: (1) на группе добровольцев (50 человек) г.Томска в возрасте от 27 до 57 лет. Группа обследуемых представляла собой случайную выборку работающего населения, добровольцы не имели тяжелых инвалидизирующих заболеваний.

Тестирование наследственной предрасположенности к **сердечно-сосудистой** патологии проводили без учета данных о состоянии здоровья пациентов. Исследуемые были разделены по возрасту на две группы: 27-35 лет и 36-57 лет. В первой группе было 53% обследованных, во второй - 47%. Анализ генотипов по 11 полиморфным вариантам предлагаемой генетической панели для диагностики

подверженности к **сердечно-сосудистым** заболеваниям проводили, как описано в табл.4.

Риск развития заболевания оценивали в зависимости от генотипа, выявленного у пациента, по методу, приведенному в табл.3. Для определения надежности оценки риска путем анализа генетических маркеров результаты оценки риска были сопоставлены с данными обследования состояния **сердечно-сосудистой** системы у изученных добровольцев. Было установлено, что в первой группе пациентов низкий риск развития **сердечно-сосудистой** патологии был у 26%, средний - у 32%, высокий - у 42%. Все пациенты с низким и средним риском развития заболевания были здоровы, в группе с высоким риском - половина пациентов имела заболевания **сердечно-сосудистой** системы с осложнениями. В возрастной группе от 36 лет и старше у 30% пациентов риск был оценен как низкий, у 52% - как средний, у 11% - как высокий. Небольшая доля пациентов, имеющих высокий риск в старшей возрастной группе, была связана с условиями формирования выборки - работающее население (следовательно, пациенты с высоким риском ССЗ, у которых в данном возрасте наследственная предрасположенность уже привела к развитию тяжелой патологии и инвалидизации). Процент страдающих **сердечно-сосудистыми** заболеваниями был выше в группе среднего и высокого риска, чем в группе низкого риска.

Оценку диагностической ценности разработанного способа генетической диагностики подверженности к **сердечно-сосудистым** заболеваниям проводили также на группе из случайным образом набранных индивидуумов (124 мужчины, средний возраст 44 года), проводили оценку риска ССЗ разными методами. Пациенты были набраны в ходе эпидемиологического исследования и были повторно обследованы спустя 10 лет.

У 77 пациентов, обследованных повторно, были измерены все параметры, необходимые для расчета 10-летнего риска СС событий на основании данных о величине систолического артериального давления, возрасте, поле, уровне общего холестерина и факторе курения расчета в программе «HeartScore» (<http://www.escardio.org/>). Распределение пациентов в подгруппах генетического риска в зависимости от оценки фенотипического риска, полученного в программе «HeartScore», представлены в табл.5-7. Выявлено, что пациенты с низким «генетическим риском» (ГР) в основном «попали» в подгруппу с низким «фенотипическим риском» (ФР) ССЗ: 20 (77%) против 6 с высоким ФР (23%). В подгруппе среднего ГР пациенты примерно поровну разделились на группы с низким и высоким ФР. Такая же закономерность наблюдалась и в группе высокого ГР. Однако в группе высокого ГР оказалось всего 9 индивидуумов (средний возраст пациентов 54 года). На следующем этапе был проведен анализ распределения пациентов по группам генетического риска в возрасте 44 и 54 года. Данные представлены в табл.8. Оказалось, что группа высокого «генетического риска» за 10 лет сократилась в 2,7 раза: с 38% до 14%, а группа низкого генетического риска увеличилась в 1,6 раза, доля пациентов со средним ГР также увеличилась (уровень значимости отличий между группами $p=0,0009$).

Такое изменение соотношения долей групп риска спустя 10 лет может свидетельствовать об элиминации из популяции индивидов с высоким генетическим риском ССЗ. Данный факт подтверждает целесообразность тестирования по разработанной панели генетических маркеров и эффективность оценки риска по предложенному алгоритму.