



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21)(22) Заявка: 2014151114/15, 17.12.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
17.12.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 17.12.2014

(43) Дата публикации заявки: 10.07.2016 Бюл. № 19

(45) Опубликовано: 27.09.2016 Бюл. № 27

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2287158 C1, 10.11.2006. RU 2334466 C2, 27.09.2008. RU 2530621 C1, 10.10.2014.

Булгакова И.В. и др. ПОЛИМОРФИЗМ А154С ГЕНА СYР1А2 И РИСК РАЗВИТИЯ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ. АНАЛИЗ АССОЦИАЦИИ И ВЗАИМОСВЯЗЬ СО СРЕДОВЫМИ ФАКТОРАМИ РИСКА. FUNDAMENTAL RESEARCH, N9, 2013, с. 994-998.

Адрес для переписки:

308015, Белгородская обл., г. Белгород, ул. Победы, 85, НИУ "БелГУ" Токтарева Татьяна Михайловна

(72) Автор(ы):

Чурносов Михаил Иванович (RU),  
Жернакова Нина Ивановна (RU),  
Кривошей Ирина Васильевна (RU),  
Полоников Алексей Валерьевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Белгородский государственный национальный исследовательский университет" (НИУ "БелГУ") (RU)

**(54) СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РИСКА РАЗВИТИЯ III СТАДИИ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ У БОЛЬНЫХ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицинской диагностики и может быть использовано как способ прогнозирования риска развития III стадии гипертонической болезни у индивидуумов русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья РФ, больных гипертонической болезнью с метаболическим синдромом. Способ включает забор крови, выделение ДНК из периферической венозной крови, анализ сочетаний полиморфизмов генов -308G/A TNF $\alpha$ , +250A/G Lta, +36A/G TNFR1,

+1663A/G TNFR2. Факторами риска развития III стадии у больных гипертонической болезнью, имеющих метаболический синдром, являются комбинации генетических вариантов -308A TNF $\alpha$  с +1663G TNFR2, или +250G Lta с +36G TNFR1, или +250G Lta с +1663G TNFR2. При определении комбинации -308GG TNF $\alpha$  с +250A Lta, или -308G TNF $\alpha$  с +250AA Lta, или -308G TNF $\alpha$  с +250A Lta прогнозируют низкий риск развития III стадии у больных гипертонической болезнью с метаболическим синдромом. 5 ил., 6 пр.

C 2  
2 5 9 8 7 4 5  
R U

R U  
2 5 9 8 7 4 5  
C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2014151114/15, 17.12.2014**(24) Effective date for property rights:  
**17.12.2014**

Priority:

(22) Date of filing: **17.12.2014**(43) Application published: **10.07.2016** Bull. № 19(45) Date of publication: **27.09.2016** Bull. № 27

Mail address:

**308015, obl. Belgorodskaya, g. Belgorod, ul. Pobedy,  
d. 85, NIU "BelGU" Toktareva Tatyana Mikhajlovna**

(72) Inventor(s):

**Churnosov Mikhail Ivanovich (RU),  
Krivoshej Irina Vasilevna (RU),  
Zhernakova Nina Ivanovna (RU),  
Polonikov Aleksej Valerevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe  
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego  
professionalnogo obrazovaniya "Belgorodskij  
gosudarstvennyj natsionalnyj issledovatel'skij  
universitet" (NIU "BelGU") (RU)**(54) **METHOD FOR PREDICTION OF RISK OF STAGE III HYPERTENSIVE DISEASE IN PATIENTS WITH HYPERTENSION WITH METABOLIC SYNDROME**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medical diagnostics and can be used as a method for prediction of risk of stage III hypertensive disease in Russian individuals who are natives of Central Black Earth Region of Russian Federation, suffering from hypertension disease with metabolic syndrome. Method involves blood sampling, DNA recovery from peripheral venous blood, analysis of combinations of polymorphisms of genes -308G/A TNF $\alpha$ , +250A/G Lta, +36A/G TNFR1, +1663A/G TNFR2. Factors of risk of stage III in patients of hypertension with metabolic syndrome, are combinations of genetic

variants -308A TNF $\alpha$  with +1663G TNFR2, or +250G Lta with +36G TNFR1, or +250G Lta with +1663G TNFR2. When determining combination -308GG TNF $\alpha$  with +250A Lta, or -308G TNF $\alpha$  with +250AA Lta, or -308G TNF $\alpha$  with +250A Lta low risk of stage III in patients with hypertension disease with metabolic syndrome is predicted.

EFFECT: prediction of risk of stage III hypertensive disease in Russian individuals who are natives of Central Black Earth Region of Russian Federation, suffering from hypertension disease with metabolic syndrome.

1 cl, 5 dwg, 6 ex

Изобретение относится к области медицинской диагностики, может быть использовано для прогнозирования риска развития III стадии гипертонической болезни у больных гипертонической болезнью с метаболическим синдромом.

5 Гипертоническая болезнь наряду с ожирением, гиперинсулинемией, дислипидемией входит в состав метаболического синдрома [Клинические рекомендации по ведению больных с метаболическим синдромом, 2013]. У 60% пациентов, страдающих только гипертонической болезнью и не имеющих других клинических симптомов, на основе лабораторных тестов диагностируют метаболический синдром [Артериальная гипертония и метаболический синдром: к вопросу о возможностях метформина и  $\beta$ -блокаторов /О.Д. Остроумова, А.А. Зыкова, С.А. Жижина [и др.] //Consilium medicum. - 2008. - Т. 10, №5 - С. 73-79]. Риск сердечно-сосудистых заболеваний увеличивается у 10 женщин в 5,9 раз, у мужчин - в 2,3 раза при сочетании гипертонической болезни с метаболическими нарушениями. Кроме того, гипертоническая болезнь у индивидуумов с метаболическим синдромом отличается ранней манифестацией заболевания и более 15 высокими цифрами артериального давления [Место комбинированной терапии в лечении больных с метаболическим синдромом /И.Е. Чазова, Ю.В. Жернакова, В.Б. Мычка // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. - 2010. - №4 - С. 104-106].

Следует подчеркнуть, что больные гипертонической болезнью в большинстве случаев (70%) не знают о наличии у себя данного заболевания и поэтому своевременно не 20 обращаются за медицинской помощью и выявление гипертонической болезни происходит на стадиях, сопровождающихся поражением органов-мишеней и развитием ассоциированных клинических состояний. При этом положительный эффект от лечения регистрируется только у 22% пациентов [Национальные клинические рекомендации [Текст] /Всерос. науч. о-во кардиологов; под ред. Р. Г. Оганова. - 3-е изд. - Москва: 25 Силиця-Полиграф, 2010. - 592 с. ]. Поэтому прогнозирование риска развития III стадии гипертонической болезни позволит формировать среди больных метаболическим синдромом группы риска и своевременно реализовывать в этих группах необходимые лечебно-профилактические мероприятия по предупреждению прогрессирования гипертонической болезни.

30 Важную роль в патогенезе гипертонической болезни играют цитокины, в частности факторы некроза опухолей и их рецепторы, которые обладают множеством медико-биологических эффектов и могут влиять на развитие и прогрессирование данной патологии [Li, Y. Y. Tumor necrosis factor-alpha g308 $\alpha$  gene polymorphism and essential hypertension: a meta-analysis involving 2244 participants [Text] /Y. Y. Li //PLoS One. - 2012. - 35 Vol.7, №4. - Art. e35408].

Среди цитокинов особого внимания заслуживает фактор некроза опухоли  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) - белок, состоящий из 157 аминокислот. TNF $\alpha$  представляет собой провоспалительный многофункциональный цитокин, который синтезируется активированными макрофагами, моноцитами, нейтрофилами, дендритными клетками, Т- и В-лимфоцитами, 40 эндотелиальными, гладкомышечными клетками, натуральными киллерами и тучными клетками [Hollegaard, M.V. Cytokine gene polymorphism in human disease [Text] /M.V. Hollegaard, J.L. Bidwell //Genes Immun. - 2006. - Vol.7. - Suppl. 3. - P. 269-276]. Он является активатором иммунной системы, регулирует воспалительные реакции, а также выполняет роль вазоактивного медиатора [The -308G/A of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and 825C/T 45 of guanidine nucleotide binding protein 3 (GNB3) are Associated with the Onset of Acute Myocardial Infarction and Obesity in Taiwan [Text] /W.-T. Chang, Y.-C. Wang, C.-C. Chen [et al.] //Int. J. Mol. Sci. - 2012. - Vol.13, №2. - P. 1846-1857].

Лимфотоксин  $\alpha$  (L $\alpha$  или TNFbeta) представляет собой провоспалительный цитокин

и относится к семейству фактора некроза опухоли.  $L\alpha$  по своей структуре и по происхождению схож с  $TNF\alpha$ . Они представляют собой два близких белка, имеющих около 30% гомологичных аминокислотных остатков [Tandem arrangement of the genes coding for tumor necrosis factor (TNF-alpha) and lymphotoxin (TNF-beta) in the human genome /S.A. Nedospasov, A.N. Shakhov, R.L. Turetskaya et al. //Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. - 1986. - Vol.51. - P. 611-625]. Лимфотоксин  $\alpha$  вырабатывается В и Т лимфоцитами, а также эпителио- и эндотелиоцитами, фибробластами, астроцитами, миеломными клетками, но в меньших количествах и значительно медленнее (на 2-е - 3-и сутки после активации) по сравнению с  $TNF\alpha$  [Lymphotoxin-alpha and cardiovascular disease: clinical association and pathogenic mechanisms [Text] /J. J.Naoum, H. Chai, P. H. Lin [et al.] //Med. Sci. Monit. - 2006. - Vol.12, №7. - P. RA121-RA124]. Кроме того, их отличает то, что  $L\alpha$  не синтезируется макрофагами и не вырабатывается в ответ на появление бактериальных эндотоксинов.

$TNF\alpha$  и  $L\alpha$  являются плеiotропными цитокинами и проявляют сходную активность в воспалительных реакциях, иммунных и опухолевых процессах [Association of cytokine gene polymorphisms with psoriasis in cases from the Nile Delta of Egypt [Text] /A. Settin, H. Hassan, R. El-Baz [et al.] //Acta Dermatovenerol. Alp. Pannonica Adriat. - 2009. - Vol.18, №3. - P. 105-112]. Для реализации своих эффектов  $L\alpha$  и  $TNF\alpha$  взаимодействуют с одними и теми же рецепторами.

Рецептор фактора некроза опухоли 1-го типа (TNFR1), который известен также как CD120a, имеет большое значение в передаче сигнала. Он реализует все возможные виды действий факторов некроза опухолей, такие как апоптоз, пролиферация и дифференцировка клеток, плюс ко всему проявляет противовирусную активность, регулирует воспалительный ответ [Peripheral receptor targets for analgesia: novel approaches to pain treatment [Text] /ed. by E. C. Brian. - Hoboken, N.J.: John Wiley Sons, 2009. - 541 p.].

Рецептор фактора некроза опухоли 2-го типа TNFR2, который известен также как CD120b, обеспечивает реализацию метаболических эффектов факторов некроза опухолей, регулируя углеводный и жировой обмен. Также TNFR2 вовлечен в регуляцию транскрипции генов, отвечающих за адаптацию клетки [Fischer, R. A soluble TNF receptor 2 agonist as a new therapeutic approach to treat autoimmune and demyelinating diseases [Text]: Einlöslicher TNF Rezeptor 2 Agonist als neuer therapeutischer Ansatz zur Behandlung von Autoimmun- und Demyelinisierenden Erkrankungen /R. Fischer; Institut für Zellbiologie und Immunologie Universität Stuttgart. - Stuttgart, 2011. - 139 p.].

В изученной научно-медицинской и доступной патентной литературе авторами не было обнаружено способа прогнозирования риска развития III стадии у больных гипертонической болезнью с метаболическим синдромом на основе данных о сочетаниях генетических полиморфизмов -308G/A  $TNF\alpha$ , +250A/G  $L\alpha$ , +36A/G TNFR1, +1663A/G TNFR2.

Для оценки сложившейся патентной ситуации был выполнен поиск по охраняемым документам за период с 1990 по 2012 гг. Анализ документов производился по направлению: способ прогнозирования риска развития III стадии у больных гипертонической болезнью с метаболическим синдромом на основе молекулярно-генетических данных в зависимости от полиморфных маркеров генов факторов некроза опухолей и их рецепторов.

Известен способ прогнозирования развития метаболического синдрома при артериальной гипертонии у мужчин по заявке на изобретение №RU2005108895/15 (публикация: 10.09.2006), включающий забор крови и определение биохимических показателей, стабильности клеточных мембран и расчет прогностического

коэффициента.

Недостаток метода заключается в том, что он рассматривает риск развития метаболического синдрома, во-первых, только у мужчин. Во-вторых, не рассматриваются гены-кандидаты, связанные с воспалительным механизмом развития гипертонической болезни и метаболического синдрома, и не определяются риски развития III стадии у больных гипертонической болезнью с метаболическим синдромом, например ожирением, гиперинсулинемией, дислипидемией.

Задачей настоящего исследования является расширение арсенала способов диагностики, а именно создание способа прогнозирования развития III стадии гипертонической болезни у больных гипертонической болезнью с метаболическим синдромом на основе данных о сочетаниях генетических вариантов.

Технический результат использования изобретения - получение критериев оценки риска развития III стадии гипертонической болезни у индивидуумов русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья, страдающих гипертонической болезнью I стадии с метаболическим синдромом, т.е ожирением, гиперинсулинемией, дислипидемией, на основе данных о сочетаниях генетических вариантов локусов -308G/A TNF $\alpha$ , +250A/G Lt $\alpha$ , +36A/G TNFR1, +1663A/G TNFR2.

В соответствии с поставленной задачей был разработан способ прогнозирования риска развития III стадии у больных гипертонической болезнью с метаболическим синдромом, включающий:

- забор крови;
- выделение ДНК из периферической венозной крови;
- анализ полиморфизмов генов -308G/A TNF $\alpha$ , +250A/G Lt $\alpha$ , +36A/G TNFR1, +1663A/G TNFR2;
- прогнозирование повышенного риска развития III стадии гипертонической болезни у больных гипертонической болезнью с метаболическим синдромом в случае выявления комбинаций генетических вариантов -308A TNF $\alpha$  с +1663G TNFR2, или +250G Lt $\alpha$  с +36G TNFR1, или +250G Lt $\alpha$  с +1663G TNFR2;
- прогнозирование низкого риска развития III стадии гипертонической болезни у больных гипертонической болезнью с метаболическим синдромом в случае выявления комбинаций генетических вариантов: -308GG TNF $\alpha$  с +250A Lt $\alpha$ , или -308G TNF $\alpha$  с +250AA Lt $\alpha$ , или -308G TNF $\alpha$  с +250A Lt $\alpha$ .

Новизна и изобретательский уровень заключается в том, что из уровня техники не известна возможность прогноза риска развития III стадии гипертонической болезни у больных гипертонической болезнью с метаболическим синдромом по данным о сочетаниях генетических вариантов локусов -308G/A TNF $\alpha$ , +250A/G Lt $\alpha$ , +36A/G TNFR1, +1663A/G TNFR2.

Способ осуществляют следующим образом:

ДНК выделяют из образцов периферической венозной крови индивидуумов в 2 этапа. На первом этапе к 4 мл крови добавляют 25 мл лизирующего буфера, содержащего 320 мМ сахарозы, 1% тритон X-100, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ трис-HCl (pH=7,6). Полученную смесь перемешивают и центрифугируют при 4°C, 4000 об/мин в течение 20 минут. После центрифугирования надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют 4 мл раствора, содержащего 25 мМ ЭДТА (pH=8,0) и 75 мМ NaCl, ресуспензируют. Затем прибавляют 0,4 мл 10% SDS, 35 мкл протеиназы К (10 мг/мл) и инкубируют образец при 37°C в течение 16 часов.

На втором этапе из полученного лизата последовательно проводят экстракцию ДНК равными объемами фенола, фенол-хлороформа (1:1) и хлороформа с

центрифугированием при 4000 об/мин в течение 10 минут. После каждого центрифугирования производят отбор водной фазы. ДНК осаждают из раствора двумя объемами охлажденного 96% этанола. Сформированную ДНК растворяют в бидистиллированной, деионизованной воде и хранят при -20°C. Выделенную ДНК

использовали для проведения полимеразной цепной реакции синтеза ДНК.

Анализ локусов -308G/A TNF $\alpha$ , +250G/A Lta, +36A/G TNFR1, +1663A/G TNFR2 осуществляют методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК. ПЦР проводят на аппарате IQ5 (Bio-Rad) в режиме real time с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров и зондов, синтезированных фирмой «Синтол» с последующим анализом полиморфизмов методом дискриминации аллелей. Для дискриминации аллелей использовалась программа Bio-Rad «IQ5-Standard Edition».

На фигурах 1-4 две полосы, вертикальная и горизонтальная, делят график на четыре секции: одна для каждого гомозиготного состояния, одна для гетерозиготного состояния и секция без реакции. Присвоение генотипов неизвестным образцам определяется вычерчиванием RFU для одного флуорофора (на оси x) относительно RFU для другого флуорофора (на оси y) на диаграмме дискриминации аллелей.

- Если значения RFU неизвестного образца находятся выше горизонтальной полосы и правее вертикальной полосы, генотип гетерозиготен (GA).

- Если значения RFU неизвестного образца находятся ниже горизонтальной полосы и левее вертикальной, определение генотипа невозможно (в данном случае неопределенный образец - отрицательный контроль).

Для фигур 1, 3:

- Если значения RFU неизвестного образца находятся выше горизонтальной полосы и левее вертикальной полосы, генотип гомозиготен по аллелю А (RFU аллеля А отложены по оси y).

- Если значения RFU неизвестного образца находятся ниже горизонтальной полосы и правее вертикальной, генотип гомозиготен по аллелю G (RFU аллеля G отложены по оси x).

Для фигур 2, 4:

- Если значения RFU неизвестного образца находятся выше горизонтальной полосы и левее вертикальной полосы, генотип гомозиготен по аллелю G (RFU аллеля G отложены по оси y).

- Если значения RFU неизвестного образца находятся ниже горизонтальной полосы и правее вертикальной, генотип гомозиготен по аллелю А (RFU аллеля А отложены по оси x).

Изобретение охарактеризовано на следующих чертежах:

фиг. 1, где представлена дискриминация аллелей по локусу -308G/A TNF $\alpha$ , где ○ - гомозиготы-308AA TNF $\alpha$ , □ - гомозиготы-308GG TNF $\alpha$ , Δ - гетерозиготы-308GA TNF $\alpha$ , ◇ - отрицательный контроль;

фиг. 2, где представлена дискриминация аллелей по локусу +250A/G Lta, где ○ - гомозиготы+250GG Lta, Δ - гетерозиготы+250AG Lta, □ - гомозиготы+250AA Lta, ◇ - отрицательный контроль;

фиг. 3, где представлена дискриминация аллелей по локусу +36A/G TNFR1, где ○ - гомозиготы+36AA TNFR1, Δ - гетерозиготы+36AG TNFR1, □ - гомозиготы+36GG TNFR1, ◇ - отрицательный контроль;

фиг. 4, где представлена дискриминация аллелей по локусу +1663A/G TNFR2, где ○ - гомозиготы+1663GG TNFR2, Δ - гетерозиготы+1663AG TNFR2, □ - гомозиготы+1663AA TNFR2, ◇ - отрицательный контроль;

фиг. 5, на которой представлена таблица, где показана распространенность сочетаний аллелей/генотипов генов факторов некроза опухолей и их рецепторов у больных гипертонической болезнью III стадии с метаболическим синдромом и в контрольной группе.

5 Возможность использования предложенного способа для оценки риска развития III стадии гипертонической болезни у больных гипертонической болезнью с метаболическим синдромом подтверждает анализ результатов наблюдений 54 пациентов с метаболическим синдромом и гипертонической болезнью III стадии и 531 человек контрольной группы. Формирование выборок больных и контроля осуществлялись  
10 на базе кардиологического отделения Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа.

Критерии включения в исследуемые выборки:

1. Индивидуумы русской национальности, являющиеся уроженцами Центрального Черноземья РФ и не имеющие родства между собой.
- 15 2. Добровольное согласие пациентов на проведение исследования.
3. В группу больных включались индивидуумы только после установления диагноза гипертонической болезни и наличия метаболического синдрома, как ожирение, гиперинсулинемия, дислипидемия, который подтверждался клиническими и лабораторно-инструментальными методами обследования, в соответствии с обязательными  
20 диагностическими стандартами, рекомендованными ВНОК [Рекомендации ВНОК, 2010].
4. В контрольную группу включались индивидуумы без метаболического синдрома и заболеваний сердечно-сосудистой системы.

Критерии исключения из исследуемых выборок:

- 25 1. Пациенты с симптоматическими артериальными гипертензиями.
2. Наличие тяжелой соматической патологии (печеночная, почечная недостаточность, аутоиммунные и онкологические заболевания).
3. Больные нерусской национальности, родившиеся вне Центрального Черноземья России.
- 30 4. Индивидуумы, отказавшиеся от проводимого исследования.

Типирование молекулярно-генетических маркеров осуществлялось в лаборатории «Молекулярной генетики человека» медицинского института Белгородского государственного национального исследовательского университета.

Изучение роли комбинаций генетических вариантов -308G/A TNF $\alpha$ , +250G/A Lta, +36A/G TNFR1, +1663A/G TNFR2 в формирование III стадии у больных гипертонической болезнью с метаболическим синдромом проводилось с помощью программного обеспечения APSampler [<http://sources.redhat.com/cygwin/>], использующего метод Монте-Карло марковскими цепями и байесовскую непараметрическую статистику [A Gibbs sampler for identification of symmetrically structured, spaced DNA motifs with improved estimation of the signal length [Text] /A. V.Favorov, M. S. Gelfand, A. V. Gerasimova [et al.] //Bioinformatics. - 2005. - Vol.21, №10. - P. 2240-2245]. С целью минимизации ошибок 1-го рода, связанных с получением ложноположительных результатов при проведении множественных сравнений, вводили поправку Бонферрони - производили перерасчет уровня значимости  $p$  для множественных парных сравнений по формуле:  $p_{\text{cor}}=p \times n$ , где  $p$  - полученный уровень статистической значимости,  $n$  - количество парных сравнений. За статистически значимый уровень принимали  $p_{\text{cor}} \leq 0,05$  [Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA /О. Ю. Реброва. - [3-е изд.]. - Москва: Медиа Сфера, 2006. - 305 с.: ил.].

Как следует из данных, представленных в таблице на фиг. 5:

- повышенный риск развития III стадии у больных гипертонической болезнью с метаболическим синдромом (OR=2,20) определяется сочетанием двух генетических маркеров аллеля +250G Lta с аллелем +1663G TNFR2. Концентрация этой комбинации среди пациентов (57,41%) в 1,51 раза превышает аналогичный показатель контрольной группы (38,01%,  $p=0,005$ ,  $r_{cor}=0,02$ , 95% CI 1,24-3,90).

Выявлены различия в концентрациях комбинации аллеля -308A TNF $\alpha$  с аллелем +1663G TNFR2 между больными с III стадией гипертонической болезни, имеющими метаболический синдром (44,44%), и контрольной группой (17,19%). Следовательно, данное сочетание является фактором риска формирования III стадии гипертонической болезни у индивидуумов с метаболическим синдромом ( $p=0,000015$ ,  $r_{cor}=0,00006$ , OR=3,85, 95% CI 2,13-6,98).

Сочетание аллеля +250G Lta и аллеля +36G TNFR1 встречается среди больных с метаболическим синдромом и гипертонической болезнью III стадии с наибольшей частотой (57,41%) по сравнению с контролем (37,48%), т.е эта комбинация генетических вариантов цитокинов также является фактором риска развития гипертонической болезни III стадии у больных с метаболическим синдромом ( $p=0,004$ ,  $r_{cor}=0,016$ , OR=2,25, 95% CI 1,27-3,96).

Противоположной направленности различия зарегистрированы по сочетанию двух молекулярно-генетических факторов: аллеля -308G TNF $\alpha$  и генотипа +250AA Lta. В контрольной группе (52,16%) данная комбинация встречается в 1,76 раза чаще по сравнению с группой больных гипертонической болезнью, имеющих III стадию заболевания и метаболический синдром. Следовательно, данное сочетание является протективным фактором формирования III стадии гипертонической болезни у индивидуумов с метаболическим синдромом (29,63%,  $p=0,0012$ ,  $r_{cor}=0,007$ , OR=0,39, 95% CI 0,21-0,71).

Также зарегистрированы различия в распространенности сочетаний аллеля -308G TNF $\alpha$  и аллеля +250A Lta между больными гипертонической болезнью III стадии с метаболическим синдромом (81,48%) и контролем (93,41%). Данная комбинация полиморфных вариантов генов факторов некроза опухолей является протективной для формирования гипертонической болезни III стадии у больных с метаболическим синдромом ( $p=0,005$ ,  $r_{cor}=0,02$ , OR=0,31, 95% CI 0,14-0,67).

Кроме того, выявлены различия в концентрациях комбинации генотипа -308GG TNF $\alpha$  с аллелем +250A Lta между больными с III стадией гипертонической болезни, имеющими метаболический синдром (50,00%), и контрольной группой (76,46%). Данное сочетание является протективным фактором формирования у индивидуумов III стадии гипертонической болезни с метаболическим синдромом ( $p=0,00006$ ,  $r_{cor}=0,00036$ , OR=0,31, 95% CI 0,17-0,54).

Таким образом, результаты, полученные с помощью биоинформатического анализа, свидетельствуют о вовлеченности комбинаций полиморфных вариантов генов фактора некроза опухоли  $\alpha$  (-308G/A TNF $\alpha$ ), лимфотоксина  $\alpha$  (+250A/G Lta), рецептора фактора некроза опухоли 1-го типа (+36A/G TNFR1) и рецептора фактора некроза опухоли 2-го типа (+1663A/G TNFR2) в формирование III стадии у больных гипертонической болезнью, имеющих метаболический синдром.

В качестве примеров конкретного выполнения предложенного способа было проведено генетическое обследование по локусам -308G/A TNF $\alpha$ , +250A/G Lta, +36A/G TNFR1, +1663A/G TNFR2 шестерых больных русской национальности, являющихся жителями Центрального Черноземья, страдающих гипертонической болезнью I стадии



с метаболическим синдромом.

Пример 1. У пациента А. было выявлено сочетание генетических вариантов -308AA TNF $\alpha$  с +1663GG TNFR2. На основании этого у него прогнозируют неблагоприятное течение гипертонической болезни развитие III стадии заболевания и включают в группу  
5 повышенного риска развития III стадии гипертонической болезни. Ему назначен комплекс профилактических мероприятий по предупреждению развития III стадии гипертонической болезни: динамический контроль показателей артериального давления, спортивная ходьба не менее 1 часа в день, соблюдение гипохолестериновой диеты, а также ограничение употребления поваренной соли, снижение избыточного веса,  
10 нормализация психоэмоционального состояния, диспансерное наблюдение у врача кардиолога и др.

Пример 2. У пациента В. было выявлено сочетание генетических вариантов +250GG Lta с +36GG TNFR1. На основании этих результатов у него прогнозируют повышенный риск развития III стадии гипертонической болезни. Пациент В. включен в группу  
15 повышенного риска развития III стадии гипертонической болезни и ему назначен комплекс профилактических мероприятий по предупреждению развития III стадии гипертонической болезни

Пример 3. У пациента С. было выявлено сочетание генетических вариантов +250GG Lta с +1663GG TNFR2. На основании этих данных у него прогнозируют повышенный  
20 риск развития III стадии гипертонической болезни. Данный пациент включен в группу повышенного риска развития III стадии гипертонической болезни и ему назначен комплекс профилактических мероприятий по предупреждению развития III стадии гипертонической болезни.

Пример 4. У пациента Д. было выявлено сочетание генетических вариантов -308GG TNF $\alpha$  с +250A Lta и на основании этого у него прогнозируют низкий риск развития III  
25 стадии гипертонической болезни.

Пример 5. У пациента Е. было выявлено сочетание генетических вариантов -308G TNF $\alpha$  с +250AA Lta и на основании этого у него прогнозируют низкий риск развития III стадии гипертонической болезни.

Пример 6. У пациента Ж. было выявлено сочетание генетических вариантов -308G TNF $\alpha$  с +250A Lta и на основании этого у него прогнозируют низкий риск развития III  
30 стадии гипертонической болезни.

Использование данного способа позволяет прогнозировать риск возникновения III стадии гипертонической болезни у индивидуумов русской национальности, являющихся  
35 жителями Центрального Черноземья, больных гипертонической болезнью с метаболическим синдромом.

Всем пациентам с гипертонической болезнью и метаболическим синдромом при выявлении генетических факторов риска развития III стадии гипертонической болезни следует рекомендовать динамический контроль за уровнем артериального давления с  
40 последующим назначением гипотензивных лекарственных средств: ингибиторов АПФ, блокаторов кальциевых каналов, диуретиков или блокаторов рецепторов ангиотензина II, с индивидуальным подбором препарата в каждом конкретном случае; диспансерное наблюдение у врача кардиолога, проведение с профилактической целью курсов антитромботической (антиагреганты и непрямые антикоагулянты) и  
45 гиполипидемической (статины) терапии, соблюдение гипохолестериновой диеты, ограничение употребления поваренной соли, снижение избыточного веса.

Формула изобретения

Способ прогнозирования риска развития III стадии гипертонической болезни у больных гипертонической болезнью с метаболическим синдромом, включающий забор крови, отличающийся тем, что из периферической венозной крови больных выделяют ДНК, проводят анализ полиморфизмов генов -308G/A TNF $\alpha$ , +250A/G Lta, +36A/G TNFR1, +1663A/G TNFR2 и прогнозируют повышенный риск развития III стадии гипертонической болезни у индивидуумов русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья РФ, больных гипертонической болезнью с метаболическим синдромом, в случае выявления комбинаций генетических вариантов -308A TNF $\alpha$  с +1663G TNFR2, или +250G Lta с +36G TNFR1, или +250G Lta с +1663G TNFR2; а низкий риск развития III стадии гипертонической болезни у индивидуумов русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья РФ, больных гипертонической болезнью с метаболическим синдромом, прогнозируют в случае выявления комбинаций генетических вариантов -308G TNF $\alpha$  с +250A Lta.

15

20

25

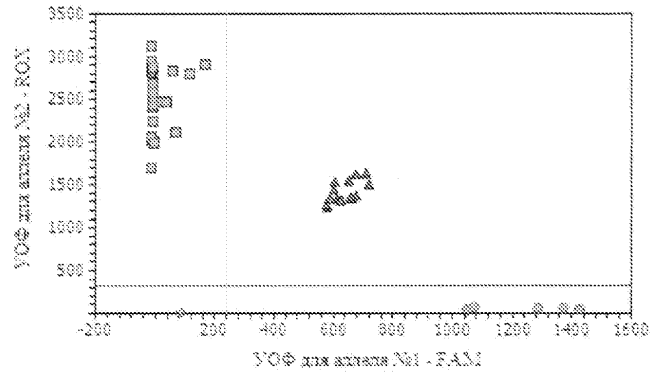
30

35

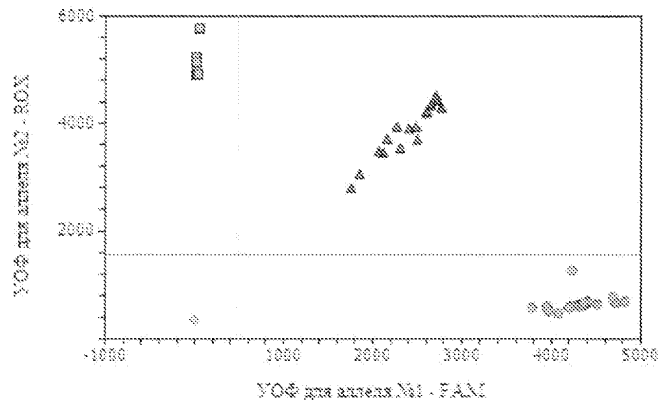
40

45

Способ прогнозирования риска развития  
III стадии у больных гипертонической  
болезнью и метаболическим синдромом

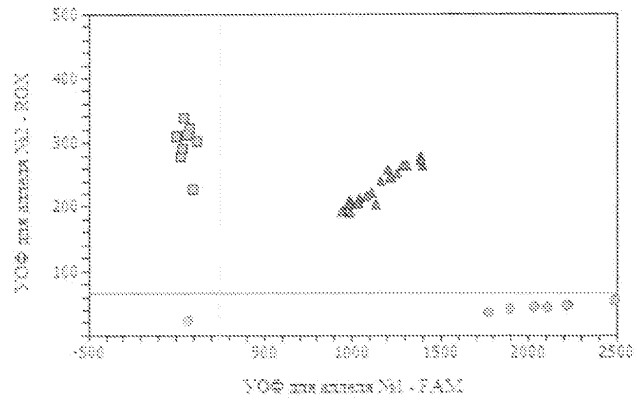


Фиг. 1

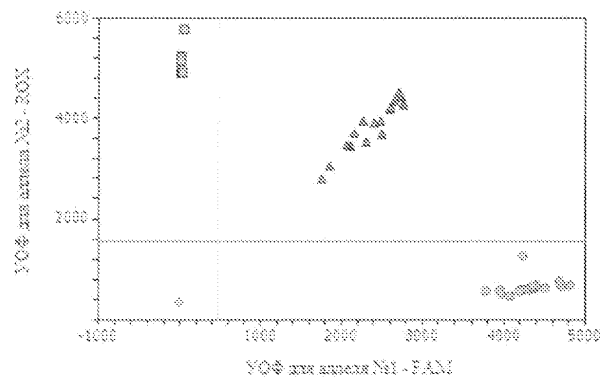


Фиг. 2

Способ прогнозирования риска развития  
III стадии у больных гипертонической  
болезнью и метаболическим синдромом



Фиг. 3



Фиг. 4

Способ прогнозирования риска развития  
III стадии у больных гипертонической  
болезнью и метаболическим синдромом

Распространенность сочетаний аллелей/генотипов генов факторов неврола опухолей и их рецепторов у больных гипертонической болезнью III стадии с метаболическим синдромом и в контрольной группе							
Полиморфизмы	Сочетание (аллели/ генотипы)	Больные III стадий ГБ с метаболическим синдромом (n=54)		Контрольная группа (n=531)		P (P <sub>max</sub> )	OR (95% CI)
		n/N	%	n/N	%		
-308G/A TNF $\alpha$ , +1662A/G TNFR2	-308A TNF $\alpha$ совместно с +1663G TNFR2	24/54	44,44	71/413	17,19	0,000115 (0,00006)	3,85 (2,13- 6,98)
-308C/A TNF $\alpha$ , +250A/G Lta	-308C/A TNF $\alpha$ совместно с +250A Lta	27/54	50,00	406/531	76,46	0,00006 (0,00016)	0,31 (0,17- 0,54)
-308C/A TNF $\alpha$ , +250A/G Lta	-308G TNF $\alpha$ совместно с +250A Lta	16/54	29,63	277/531	52,16	0,0013 (0,007)	0,58 (0,21- 0,71)
+230A/G Lta, 36A/G TNFR1	+230G Lta совместно с +36G TNFR1	31/54	57,41	199/531	37,48	0,004 (0,016)	2,29 (1,27- 3,96)
-308G/A TNF $\alpha$ , +250A/G Lta	-308G TNF $\alpha$ совместно с +250A Lta	44/54	81,48	496/531	93,41	0,005 (0,02)	0,33 (0,14- 0,67)
+250A/G Lta, +1662A/G TNFR2	+250G Lta совместно с +1663G TNFR2	31/54	57,41	197/413	47,70	0,005 (0,02)	2,20 (1,24- 3,90)

Фиг. 5