



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 33/50 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2017132198, 14.09.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
14.09.2017

Дата регистрации:
08.05.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 14.09.2017

(45) Опубликовано: 08.05.2018 Бюл. № 13

Адрес для переписки:

308015, Белгородская обл., г. Белгород, ул.
Победы, 85, НИУ "БелГУ", ОИС, Токтаревой
Т.М.

(72) Автор(ы):

Чурносов Михаил Иванович (RU),
Москаленко Мария Ивановна (RU),
Сорокина Инна Николаевна (RU),
Миланова Снежана Николовна (RU),
Пономаренко Ирина Васильевна (RU),
Полоников Алексей Валерьевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

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

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: Ковалева Е. В. и др. Новый
диагностический маркер ишемического
инсульта //Фундаментальные исследования.
- 2015. - п. 7-4. - С. 679-681. Богадельников И.
В. и др. Дифференциальная диагностика
острого нарушения мозгового
кровообращения и вирусного энцефалита //
Здоровье ребенка. - 2012. - п. 4 (39).

(54) Способ прогнозирования риска развития ишемического инсульта с учетом генетических факторов

(57) Реферат:

Способ прогнозирования риска развития ишемического инсульта с учетом генетических факторов относится к биохимии. Изобретение может быть использовано для выявления риска развития инсульта у индивидуумов русской национальности, являющихся жителями Центрального Черноземья. Способ включает

выделение ДНК из периферической венозной крови, анализ генетических полиморфизмов rs3025058 MMP-3 и rs11568818 MMP-7. Сочетание генотипа 6A/6A rs3025058 MMP-3 с генотипом AA rs11568818 MMP-7 является фактором риска развития ишемического инсульта (OR=1,67). 3 ил., 3 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
G01N 33/50 (2006.01)

(21)(22) Application: **2017132198, 14.09.2017**

(24) Effective date for property rights:
14.09.2017

Registration date:
08.05.2018

Priority:

(22) Date of filing: **14.09.2017**

(45) Date of publication: **08.05.2018** Bull. № 13

Mail address:
**308015, Belgorodskaya obl., g. Belgorod, ul. Pobedy,
85, NIU "BelGU", OIS, Toktarevoj T.M.**

(72) Inventor(s):

**Churnosov Mikhail Ivanovich (RU),
Moskalenko Mariya Ivanovna (RU),
Sorokina Inna Nikolaevna (RU),
Milanova Snezhana Nikolovna (RU),
Ponomarenko Irina Vasilevna (RU),
Polonikov Aleksej Valerevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Belgorodskij gosudarstvennyj
natsionalnyj issledovatel'skij universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**

(54) **METHOD FOR PREDICTING THE RISK OF DEVELOPING AN ISCHEMIC STROKE, TAKING INTO ACCOUNT GENETIC FACTORS**

(57) Abstract:

FIELD: biochemistry.

SUBSTANCE: method of predicting the risk of developing ischemic stroke, taking into account genetic factors, refers to biochemistry. Method includes isolation of DNA from peripheral venous blood, analysis of genetic polymorphisms rs3025058 MMP-3 and rs11568818 MMP-7. Combination of the genotype

6A/6A rs3025058 MMP-3 with the AA genotype rs11568818 MMP-7 is a risk factor for the development of ischemic stroke (OR = 1.67).

EFFECT: invention can be used to identify the risk of stroke in individuals of Russian nationality who are residents of the Central Chernozem Region.

1 cl, 3 dwg, 3 ex

RU 2 653 450 C1

RU 2 653 450 C1

Изобретение относится к области медицинской диагностики и может быть использовано для прогнозирования риска развития ишемического инсульта.

В настоящее время инсульт занимает первые позиции по заболеваемости, инвалидизации и смертности как в нашей стране, так и в мире, поэтому исследование молекулярно-генетических механизмов предрасположения к данному заболеванию остается актуальной проблемой современной генетики человека [Хронические сосудистые заболевания головного мозга [текст] / А.С. Кадыков, Л.С. Манвелов, Н.В. Шахпаронова // М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2013. – 232 с.]. В этиологии инсульта существенна генетическая компонента, однако до настоящего времени весь спектр генов, связанных с его развитием, не определен. Установлено, что с развитием ишемического инсульта связаны гены системы гемостаза, системы окиси азота, программированной клеточной гибели, а также гены матриксных металлопротеиназ (ММП) [Генетический взгляд на феномен сочетанной патологии у человека [Текст]/ В. П. Пузырев // Медицинская генетика. – 2008. – Т. 7. – № 9. – С. 3-9]. Матриксные металлопротеиназы являются эндопептидазами, отвечающими за протеолитическое расщепление всех компонентов внеклеточного матрикса и участвующими в развитии таких патологических состояний, как эссенциальная гипертензия, артрит, атеросклероз, рост и метастазирование опухолей [Матриксные металлопротеиназы и сердечно-сосудистые заболевания [Текст] / А.А. Турна, Р.Т. Тогузов // Артериальная гипертензия. – 2009. – №5. – С. 532-538; Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia [Text] / E. Candelario-Jalil, Y. Yang, G. A. Rosenberg // Neuroscience – 2012. – №158 (3). – P. 983-994].

Значительная распространенность и высокая смертность в результате осложнений данного заболевания определяют необходимость выделения критериев индивидуального прогнозирования риска развития ишемического инсульта на основании изучения полиморфных вариантов генов-кандидатов.

Матриксная металлопротеиназа 3 (ММП-3) является представителем подсемейства стромелизинов и отвечает за гидролитическое расщепление фибронектина [Matrix Metalloproteinases in Lung: Multiple, Multifarious, and Multifaceted [Text] / K.J. Greenlee, Z. Werb, F. Kheradmand // Physiological Reviews. – 2011. – №87 (1). – P. 69-98].

Цитогенетическое расположение гена, кодирующего ММП-3 – 11q22.2. Китайскими учеными установлено, что полиморфизм rs3025058 гена ММП-3, представляющий собой вставку дополнительного аденина в положении -1612, ассоциирован с развитием острых нарушений мозгового кровообращения [Association of Matrix Metalloproteinase-1 and Matrix Metalloproteinase-3 Gene Variants with Ischemic Stroke and Its Subtype [Text] / X.Y. Huang, L.Y. Han, X.D. Huang [et al.] // J. Stroke Cerebrovasc. Dis. – 2017. – Vol. 26, № 2. – P. 368-375].

Матриксная металлопротеиназа 7 (ММП-7) является представителем подсемейства матрилизинов и отвечает за протеолиз коллагена, фибронектина, желатинов, эластина и других компонентов внеклеточного матрикса [Allele-Specific Regulation of Matrix Metalloproteinase-7 Promoter Activity Is Associated With Coronary Artery Luminal Dimensions Among Hypercholesterolemic Patients [Text] / S. Jormsjö, C. Whatling, D.H. Walter [et al.] // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 2011. – Vol. 21. – P. 1834-1839].

Цитогенетическое расположение гена, кодирующего ММП-7 – 11q22.2, в его промоторной области находится полиморфизм rs11568818 ММП-7, представляющий собой замену аденина на гуанин в позиции -181. Установлено, что данный полиморфизм ассоциирован с развитием сосудистых катастроф в китайской популяции [Association between matrix metalloproteinase family gene polymorphisms and ischemic stroke: a meta-analysis

[Text] / D. Wen, X. Du, S.P. Nie [et al.] // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 2014. – Vol. 28. – P. 1832-1837].

Исследования вовлеченности генов матриксных металлопротеиназ в формирование предрасположенности к инсульту в России единичны и фрагментарны, а данных о роли генетических вариантов rs3025058 MMP-3 и rs11568818 MMP-7 в развитии ишемического инсульта нет совсем.

В изученной научно-медицинской и доступной патентной литературе авторами не было обнаружено способа прогнозирования риска развития ишемического инсульта с учетом генетических данных о сочетаниях генетических полиморфизмов rs3025058 MMP-3 и rs11568818 MMP-7.

Из области техники известен «Способ прогнозирования развития острого ишемического инсульта» по Патенту РФ №2012134988 от 20.02.2014. Способ включает учет показателей ферментов антиокислительной защиты в периферической крови, при этом в качестве ферментов антиокислительной защиты определяют каталазу, пероксидазу и показатель перекисного окисления липидов. При увеличении показателей пероксидазы и перекисной резистентности эритроцитов и снижении показателя каталазы более чем на 70% от референтных значений судят о высоком риске развития ишемического инсульта. Однако данный способ не является достаточно информативным, так как не включает генетические маркеры и применим только на клиническом этапе, что исключает раннюю диагностику и проведение профилактических мероприятий по предотвращению развития инсульта.

За прототип выбран Патент РФ № 2422523 от 22.04.2010 «Аллель SNP41 гена PDE4D, его применение для прогнозирования индивидуальной предрасположенности к инсульту в русской популяции, применение молекулярно-генетического маркера индивидуальной предрасположенности к инсульту и способ прогнозирования индивидуальной предрасположенности к инсульту». Способ включает анализ полиморфизма гена PDE4D на наличие аллеля A SNP41 и в случае выявления наличия указанного варианта аллеля прогноз предрасположенности к инсульту в русской популяции. Данный способ разработан для выявления риска развития инсульта по результатам генетического тестирования по локусу гена PDE4D. Аллель A SNP41 гена PDE4D применяется в качестве диагностического маркера при оценке высокой индивидуальной предрасположенности к инсульту в русской популяции. Изобретение позволяет диагностировать предрасположенность к инсульту в русской популяции и своевременно назначать соответствующие медикаменты. Недостатком указанного способа является использование в качестве маркера только одного генетического полиморфизма, что снижает статистическую мощность проведенного исследования.

Задачей настоящего исследования является расширение арсенала способов диагностики, а именно создание способа прогнозирования развития ишемического инсульта на основе комбинации генов матриксных металлопротеиназ.

Технический результат использования изобретения – получение критериев оценки риска развития ишемического инсульта у лиц русской национальности, уроженцев Центрального Черноземья на основе данных о сочетаниях генетических вариантов локусов rs3025058 MMP-3 и rs11568818 MMP-7.

Поставленная задача решается предложенным способом, включающим:

- выделение ДНК из периферической венозной крови лиц русской национальности, уроженцев Центрального Черноземья;
- анализ полиморфизмов генов матриксных металлопротеиназ rs3025058 MMP-3 и rs11568818 MMP-7;

- прогнозирование высокого риска развития ишемического инсульта при выявлении сочетания генотипа 6A/6A по локусу rs3025058 MMP-3 с генотипом AA по локусу rs11568818 MMP-7.

Новизна и изобретательский уровень заключаются в том, что из уровня техники не известна возможность прогноза риска развития ишемического инсульта по наличию сочетания генетических вариантов полиморфных маркеров матриксных металлопротеиназ rs3025058 MMP-3 и rs11568818 MMP-7.

Выделение геномной ДНК из периферической крови осуществляют методом фенольно-хлороформной экстракции (Mathew, 1984) в два этапа. На первом этапе к 4 мл крови с ЭДТА добавляют 25 мл лизирующего буфера, содержащего 320 мМ сахарозы, 1% тритон X-100, 5мМ MgCl₂, 10мМ трис-HCl (pH 7,6). Полученную смесь перемешивают и центрифугируют при 4°C, 4000 об/мин в течение 20 мин. 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 мин. После каждого центрифугирования производят отбор водной фазы. ДНК осаждают из раствора двумя объемами охлажденного 96% этанола. После лиофилизации полученную ДНК растворяют в бидистиллированной, деионизованной воде и хранят при -200°C. Выделенную ДНК используют для проведения полимеразной цепной реакции синтеза ДНК.

Для исследования полиморфизма rs3025058 MMP-3 используют наборы 2,5x реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ в объеме 25 мкл на 1 образец, включающие 2,5x реакционную смесь (2,5x ПЦР буфер: (KCl, ТрисHCl (pH 8,8), 6,25 мМ MgCl₂), SynTaq ДНК-полимеразу, дезоксинуклеозидтрифосфаты, глицерол, Tween 20) в объеме 10 мкл, 25мМ MgCl₂ в объеме 1,5 мкл, ddH₂O (деионизованная вода), по 10 пкмоль каждого праймера и по 5 пкмоль каждого зонда. При проведении ПЦР в амплификаторе с флуоресцентной детекцией (на амплификаторе CFX96) генотипирование осуществляют методом TagMan зондов по данным величин ОЕФ (относительные единицы флуоресценции). Для rs3025058 MMP-3 зонд с флуоресцентным красителем ROX соответствует аллелю 6A, зонд с красителем FAM – аллелю 5A (фиг. 1).

Анализ полиморфизма rs11568818 MMP-7 проводят методом ПЦР синтеза ДНК на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad) с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров и зондов с последующим анализом полиморфизма методом дискриминации аллелей. Реакционная смесь объемом 25 мкл включает: 67 мМ трис-HCl (pH 8,8), 2,5 мМ MgCl₂, 0,1 мкг геномной ДНК, по 10 пМ каждого праймера, по 5 пкмоль каждого зонда, по 200 мкМ dATP, dGTP, dCTP, dTTP и 1 единицу активной Taq-полимеразы. После денатурации (5 мин при 95°C) выполняют 40 циклов амплификации по схеме: отжиг праймеров – 1 мин при t=54°C; денатурация – 15 сек при t=95°C. При проведении ПЦР в амплификаторе (CFX96) с флуоресцентной детекцией генотипирование осуществляют методом TagMan зондов по данным величин ОЕФ (относительные единицы флуоресценции). Для rs11568818 MMP-7 зонд с флуоресцентным красителем ROX соответствует аллелю А, зонд с красителем FAM – аллелю G (фиг.2).

Выделенную ДНК подвергают полимеразной цепной реакции с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров [Elevated MMP-8 and decreased

myeloperoxidase concentrations associate significantly with the risk for atherosclerosis disease and abdominal aortic aneurysm [Text] / P. Pradhan-Palikhe, P. Vikatmaa, T. Lajunen [et al.] // Scand. J. Immunol. – 2010. – Vol. 72, № 2. – P. 150-157.].

Изобретение характеризуется фиг. 1-3:

5 Фиг. 1. Дискриминации аллелей методом детекции TaqMan зондов по данным величин ОЕФ (относительные единицы флуоресценции) каждого зонда на амплификаторе CFX96 с детектирующей системой в режиме реального времени полиморфизма rs3025058 MMP-3, где - 5A/5A, - 6A/6A, - 5A/6A, ■ - отрицательный контроль.

10 Фиг. 2. Дискриминации аллелей методом детекции TaqMan зондов по данным величин ОЕФ (относительные единицы флуоресценции) каждого зонда на амплификаторе CFX96 с детектирующей системой в режиме реального времени полиморфизма rs11568818 MMP-7, где - GG, - AA, - AG, ■ - отрицательный контроль.

15 Фиг. 3. Диаграмма взаимодействий локусов матриксных металлопротеиназ в двухлокусной модели при формировании инсульта, полученная методом GMDR с коррекцией на коварианты, где столбики слева соответствуют группе больных, столбики справа соответствуют контрольной группе.

Генотипирование полиморфизмов rs3025058 MMP-3 и rs11568818 MMP-7 осуществляют методом детекции TagMan зондов по данным величин ОЕФ (относительные единицы флуоресценции) каждого зонда на амплификаторе CFX96 с
20 детектирующей системой в режиме реального времени.

Анализ ассоциаций сочетаний генетических вариантов MMP с ишемическим инсультом проводят с помощью методов MDR (Multifactor Dimensionality Reduction) и его модификации GMDR (Generalized Multifactor Dimensionality Reduction) с использованием соответствующего программного обеспечения (MDR версии 3.0.2, <http://www.epistasis.org/mdr.html>, и GMDR версии 0.9, <http://www.ssg.uab.edu/gmdr/>) (фиг. 3).
25 В основе использованных методов лежит общий принцип выявления переменной, содержащей информацию о нескольких локусах, и формирование кластеров, содержащих комбинации генотипов высокого и низкого риска развития изучаемой патологии.

30 Возможность использования предложенного способа для оценки риска возникновения и развития ишемического инсульта подтверждает анализ результатов наблюдений 303 пациентов с инсультом и 527 индивидуумов контрольной группы. Общий объем исследуемой выборки составил 830 человек. Средний возраст пациентов с инсультом составил $59,58 \pm 8,21$ лет, а средний возраст представителей контрольной группы – $58,81 \pm 7,74$ лет. В группе больных с инсультом оказались 201 мужчина и 102 женщины,
35 а в контрольной группе – 322 мужчины и 205 женщин. В исследуемые выборки включались индивидуумы русской национальности, являющиеся уроженцами Центрального Черноземья России и не имеющие родства между собой. Группа больных с инсультом и контрольная группа полностью сопоставимы по возрасту, полу, месту рождения и национальности.

40 Все клинические и клинико-лабораторные исследования проводили на базе неврологического и кардиологического отделений Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа, с информированного согласия пациентов на использование материалов лечебно-диагностических мероприятий, проводимых за период госпитализации и после нее для научно-исследовательских целей. В работе
45 использовалась анкета-опросник, включающая антропометрические, социально-демографические показатели, а также сведения о наличии у респондентов средовых факторов риска инсульта, таких как курение, злоупотребление алкоголем, низкий уровень физической активности, особенности питания, стрессовые ситуации [Полоников,

А.В. и др., 2013]. Полученные материалы протоколировали по стандартам этического комитета Российской Федерации.

Анализ ассоциаций сочетаний генетических вариантов с ишемическим инсультом проводили с помощью методов MDR (Multifactor Dimensionality Reduction) и его модификации GMDR (Generalized Multifactor Dimensionality Reduction) с использованием соответствующего программного обеспечения (MDR версии 3.0.2, <http://www.epistasis.org/mdr.html>, и GMDR версии 0.9, <http://www.ssg.uab.edu/gmdr/>), с коррекцией на индекс массы тела, уровни холестерина, триглицеридов, липопротеидов низкой плотности, липопротеидов высокой плотности, курение, злоупотребление алкоголем, частые стрессовые ситуации. Для валидации полученных результатов проводили пермутационный тест – выполнено 1000 пермутаций при 10 кросс-валидациях, что обеспечивает $p_{perm} < 0,001$

Установлены особенности «генетической конституции» больных с ишемическим инсультом на основе комбинаций генов матриксных металлопротеиназ. Выявлена комбинация, являющаяся значимым предиктором риска развития ишемического инсульта: сочетание генотипа 6A/6A rs3025058 MMP-3 с генотипом AA rs11568818 MMP-7 наблюдается у 12,21% пациентов с инсультом и у 7,59% индивидуумов контрольной группы ($\chi^2=4,06$, $p=0,04$). Таким образом, наличие данного сочетания является фактором риска развития ишемического инсульта (OR=1,67, 95% CI 1,01-2,74) независимо от влияния средовых факторов ишемического инсульта.

В качестве примеров конкретного применения разработанного способа приведено обследование добровольцев русской национальности, являющихся жителями Центрального Черноземья и не являющихся родственниками между собой: проведено генетическое обследование по локусам rs3025058 MMP-3 и rs11568818 MMP-7.

Пример 1. У пациента С. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров было выявлено, что генотип мужчины по локусу rs3025058 MMP-3 – 6A/6A, генотип по локусу rs11568818 MMP-7 – AA. Сочетание генотипа 6A/6A (rs3025058 MMP-3) и генотипа AA (rs11568818 MMP-7) позволило отнести пациента в группу больных с высоким риском развития ишемического инсульта. Дальнейшее наблюдение и результаты ультразвукового дуплексного сканирования (УЗДС) выявили у пациента окклюзивное заболевание сонных артерий (нарушение мозгового кровоснабжения), что подтвердило высокий риск развития инсульта по ишемическому типу.

Пример 2. У пациентки Н. произведен забор венозной крови, при генотипировании ДНК-маркеров выявлено, что ее генотип по локусу rs3025058 MMP-3 – 6A/6A, генотип по локусу rs11568818 MMP-7 – GG. По данным генотипирования пациентка Н. не включается в группу больных с высоким риском развития инсульта. При дальнейшем наблюдении не было зафиксировано нарушений мозгового кровообращения.

Пример 3. У пациента Ф. после забора венозной крови из локтевой вены и последующего генотипирования выявлен генотип 5A/5A по локусу rs3025058 MMP-3 и генотип AA по локусу rs11568818 MMP-7. По данным генотипирования пациент Ф. не включается в группу больных с высоким риском развития ишемического инсульта. Дальнейшее обследование показало, что мозговое кровообращение пациента Ф. соответствует норме.

Применение данного способа позволит на доклиническом этапе формировать среди пациентов группы риска и своевременно реализовывать в этих группах необходимые лечебно-профилактические мероприятия по предупреждению развития ишемического инсульта.

(57) Формула изобретения

Способ прогнозирования риска развития ишемического инсульта с учетом генетических факторов индивидуумов русской национальности, являющихся жителями Центрального Черноземья, включающий выделение ДНК и анализ полиморфизма генов, отличающийся тем, что проводят анализ полиморфизмов генов матриксных металлопротеиназ rs3025058 MMP-3 и rs11568818 MMP-7 и прогнозируют высокий риск развития ишемического инсульта при выявлении сочетания генотипа 6А/6А по локусу rs3025058 MMP-3 с генотипом АА по локусу rs11568818 MMP-7.

10

15

20

25

30

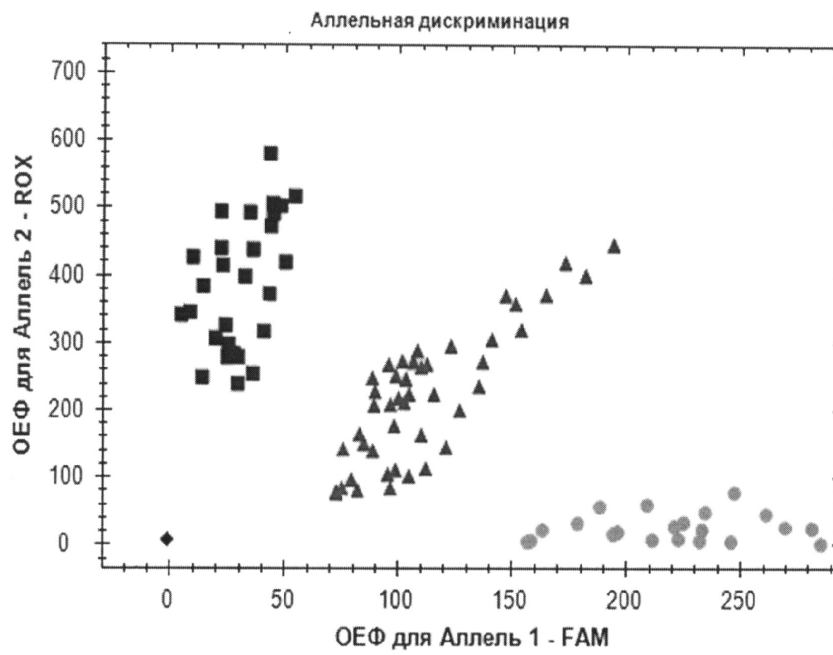
35

40

45

1

Способ прогнозирования риска развития
ишемического инсульта
с учетом генетических факторов

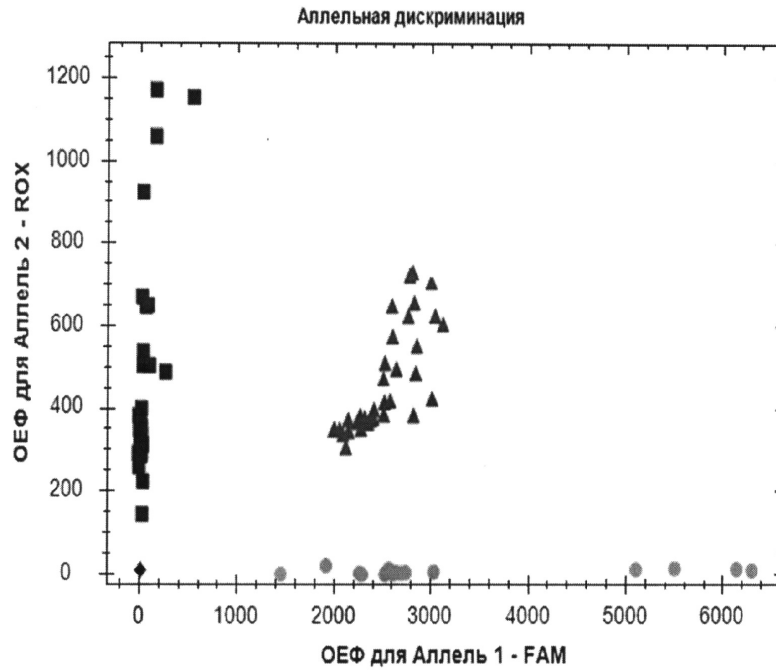


Фиг. 1

1

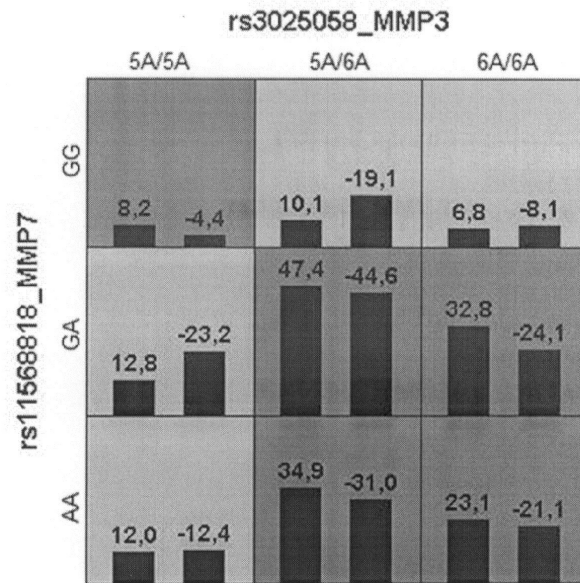
2

Способ прогнозирования риска развития
ишемического инсульта
с учетом генетических факторов



Фиг. 2

Способ прогнозирования риска развития
ишемического инсульта
с учетом генетических факторов



Фиг. 3