

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201900574** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.11.30

(51) Int. Cl. *A61B 10/00* (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)
C12Q 1/68 (2018.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.05.27

(54) **СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РИСКА РАЗВИТИЯ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ У ЛИЦ, ПОДВЕРГАЮЩИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНОГО СТРЕССА**

(96) 2019000052 (RU) 2019.05.27

(71) Заявитель:
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ "НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ МЕДИЦИНЫ ТРУДА
ИМЕНИ АКАДЕМИКА Н.Ф.
ИЗМЕРОВА" (ФГБНУ "НИИ МТ")
(RU)**

(72) Изобретатель:
**Кузьмина Людмила Павловна,
Бухтияров Игорь Валентинович,
Хотулева Анастасия Григорьевна,
Коляскина Мария Михайловна (RU)**

(57) Изобретение относится к медицине и может быть использовано для прогнозирования риска развития гипертонической болезни у лиц, подвергающихся воздействию психоэмоционального стресса. Задачей настоящего изобретения является повышение степени достоверности прогнозирования риска развития гипертонической болезни у лиц, подвергающихся воздействию психоэмоционального стресса, например, во время работы. Указанная задача достигается тем, что проводят молекулярно-генетическое исследование для выявления однонуклеотидных полиморфизмов в геноме лиц, подвергающихся воздействию психоэмоционального стресса, по результатам которого прогнозируют персонализированный риск развития гипертонической болезни. Техническим результатом изобретения является возможность своевременного выявления лиц, предрасположенных к развитию гипертонической болезни при воздействии психоэмоционального стресса, для предупреждения ее развития. Предложенный способ может быть использован, например, в процессе проведения диспансеризации или периодических медицинских осмотров большого количества работающих или поступающих на работу в условиях воздействия психоэмоционального стресса.

A1

201900574

201900574

A1

Способ прогнозирования риска развития гипертонической болезни у лиц, подвергающихся воздействию психоэмоционального стресса

Изобретение относится к медицине и может быть использовано для прогнозирования риска развития гипертонической болезни у лиц, подвергающихся воздействию психоэмоционального стресса.

Известен способ прогнозирования риска развития гипертонической болезни у лиц, подвергающихся воздействию психоэмоционального стресса, включающий забор венозной крови, выделение ДНК из лимфоцитов периферической венозной крови, проведение полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами, выявление полиморфизма Thr174Met в гене ангиотензиногена AGT. (Золотова Е.А. Полиморфизм генов-маркёров, эмоциональные и когнитивные отклонения у подростков с первичной артериальной гипертензией, их сопряжённость с нарушениями элементного статуса, Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, Иваново, 2011, с. 9-10).

Однако, данный способ осуществляет прогнозирование риска развития гипертонической болезни у лиц, подвергающихся воздействию психоэмоционального стресса, только на основе выявления полиморфных вариантов генов ренинангиотензиновой системы, не учитывая их наследственной предрасположенности к воздействию психоэмоционального стресса. Это снижает степень достоверности прогнозирования риска развития гипертонической болезни у лиц, подвергающихся воздействию психоэмоционального стресса, например, при проведении диспансеризации или периодических медицинских осмотров большого количества работающих за короткие (сжатые) сроки времени.

Задачей настоящего изобретения является повышение степени достоверности прогнозирования риска развития гипертонической болезни у лиц, подвергающихся воздействию психоэмоционального стресса, путем выявления наследственной предрасположенности к воздействию психоэмоционального стресса, в процессе проведения предварительных медицинских осмотров большого количества лиц, подвергающихся воздействию психоэмоционального стресса, например, в процессе работы.

Техническим результатом изобретения является возможность своевременного выявления лиц предрасположенных к развитию гипертонической болезни при воздействии психоэмоционального стресса, для предупреждения ее развития путем рационального

трудоустройства вне воздействия психоэмоционального стресса и формирования групп повышенного риска с целью проведения своевременной коррекции для повышения адаптационных способностей организма различными неспецифическими способами.

Указанная задача достигается тем, что в известном способе прогнозирования риска развития гипертонической болезни у лиц, подвергающихся воздействию психоэмоционального стресса, включающем забор венозной крови, выделение генетического материала, проведение полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами для выявления полиморфизма Thr174Met в гене ангиотензиногена AGT, выявление полиморфизма Thr174Met в гене ангиотензиногена AGT, дополнительно проводят полимеразную цепную реакцию со специфическими праймерами для выявления полиморфизма Val66Met в гене нейротрофического фактора мозга BDNF, далее осуществляют анализ продуктов амплификации методом флуоресцентной детекции в режиме реального времени, при этом выявляют полиморфизм Val66Met в гене нейротрофического фактора мозга BDNF, причем при обнаружении одновременно неблагоприятной аллели М гена BDNF Val66Met и неблагоприятной аллели Т гена AGT Thr174Met прогнозируют высокий риск развития гипертонической болезни у лиц, подвергающихся воздействию психоэмоционального стресса.

Нейротрофический фактор мозга BDNF играет важную роль в развитии и функционировании ЦНС, во многом определяет устойчивость к стрессу, эмоциональность и способность к коммуникации. Для этого гена известна мутация Val66Met. Для носителей Met-формы этого гена характерна пониженная устойчивость к стрессу и способность к коммуникации наряду с большей эмоциональностью и стремлением к поиску новизны. BDNF обладает выраженными нейрозащитными свойствами, в том числе при психоэмоциональном напряжении, угнетает клеточный апоптоз, препятствует гибели нейронов, стимулирует рост холинергических нервных волокон и др.

Ген AGT кодирует белок ангиотензиноген, сывороточный глобулин, вырабатываемый клетками печени, из которого образуется ангиотензин I. Ангиотензин I преобразуется в активный ангиотензин II под действием ангиотензинпревращающего фермента. Наличие неблагоприятной аллели неблагоприятной аллели Т гена AGT Thr174Met приводит к повышенному содержанию ангиотензиногена в плазме, что может приводить к развитию артериальной гипертонии.

Таким образом, при одновременном обнаружении неблагоприятной аллели М гена BDNF Val66Met и неблагоприятной аллели Т гена AGTThr174Met прогнозируют высокий риск развития гипертонической болезни у лиц подвергающихся воздействию психоэмоционального стресса, в связи со снижением нейрозащитных свойств нейротрофического фактора мозга при психоэмоциональном напряжении. Это приводит к снижению устойчивости к стрессу и формированию эмоционального возбуждения в головном мозге, которое, в свою очередь, приводит к стойкому изменению механизмов регуляции артериального давления и повышению риска развития гипертонической болезни, а также повышенному содержанию ангиотензиногена, являющегося одним из ведущих компонентов в патогенезе артериальной гипертонии.

Проведенные исследования по патентным и научно-техническим информационным источникам показали, что предлагаемый способ неизвестен и не следует явным образом из изученного уровня техники, т.е. соответствует критериям “новизна” и “изобретательский уровень”.

Предлагаемый способ может быть применен в клинических, биохимических, молекулярно-генетических лабораториях, укомплектованных оборудованием, выпускаемым отечественной или зарубежной промышленностью.

Следовательно, заявленный способ является доступным и практически применимым.

Предлагаемый способ осуществляют следующим образом.

У пациентов осуществляют забор венозной крови.

Далее из цельной крови выделяют ДНК с использованием, например, комплекта реагентов для экстракции ДНК из клинического материала "Ампли Прайм ДНК-сорб-В" в соответствии с инструкцией к используемому комплекту.

Из полученного препарата ДНК (объемом 50 мкл) готовят серии разведений в ТЕ-буфере до конечной концентрации (1÷3) нг/мкл. Данный раствор ДНК используют для постановки полимеразной цепной реакции.

Выявление полиморфизма Val66Met гена BDNF проводят с помощью тест-системы, включающей два зонда типа TagMan, ориентированных на нуклеотидную замену в ДНК, определяющую полиморфизм Val66Met гена BDNF, и два праймера ПЦР, ограничивающих участок ДНК с этой заменой внутри. Объем амплификационной смеси – 25 мкл.

Полимеразную цепную реакцию для выявления полиморфизма Val66Met гена BDNF проводят по следующей программе. При использовании амплификатора «CFX 96» (BioRad, США) выдерживают пробирки при +94°C – 3 мин, затем 40 циклов: при 94°C – 15 с, при 64°C – 40 с. При этом используют каналы FAM и HEX. Детекция продуктов амплификации осуществляют на каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала: по каналу FAM – для аллели Val, по каналу HEX – для аллели Met.

Выявление полиморфизма Thr174Met гена AGT проводят с помощью наборов, например, «СИНТОЛ», Россия. При этом используют набор реагентов «SNP-Скрин» полиморфизма Arg16Gly гена β 2-адренергического рецептора и полиморфизма C3872T гена С-реактивного белка. Объем амплификационной смеси – 25 мкл.

Полимеразную цепную реакцию для выявления полиморфизма Thr174Met гена AGT проводят по следующей программе.

При использовании амплификатора «CFX 96» (BioRad, США) выдерживают пробирки при +94°C – 3 мин, затем 40 циклов: при 94°C – 15 с, при 64°C – 40 с. При этом используют каналы FAM и HEX. Детекция продуктов амплификации осуществляют на каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала: по каналу FAM – для аллели Thr, по каналу HEX – для аллели Met.

При одновременном обнаружении неблагоприятной аллели М гена BDNF Val66Met и неблагоприятной аллели Т гена AGT Thr174Met прогнозируют высокий риск развития гипертонической болезни у лиц, подвергающихся воздействию психоэмоционального стресса.

Пример 1.

Пациент Д., 26 лет. Профессия – Сотрудник оперативно-сысского подразделения органов внутренних дел, группа предназначения - 2. Стаж – 8 лет. Работа заключается в подготовке и осуществлении следственных действий и проведению оперативно-разыскных мероприятий по предупреждению, пресечению и раскрытию преступлений. Ежегодно проводились периодические медицинские осмотры, у пациента Д. выявлено развитие ГБ 1 стадии, АГ – 2 степени, риск 1-2 через 6 лет после начала работы в органах ОВД.

Кровь больного исследовалась заявленным способом: из 100 мкл цельной крови выделяют ДНК сорбент однопробирочным методом с использованием комплекта для выделения "ДНК-сорб-В" (ТУ9398-071-01897593-2008), в соответствии с инструкцией к используемому комплекту.

Из полученного препарата ДНК (объемом 50 мкл) готовили серии разведений в ТЕ-буфере до конечной концентрации ($1 \div 3$) нг/мкл. Данный раствор ДНК использовали для постановки реакции амплификации.

Выявление полиморфизма Val66Met гена BDNF проводили с помощью тест-системы, включающей два зонда типа TagMan, ориентированных на нуклеотидную замену в ДНК, определяющую полиморфизм Val66Met гена BDNF, и два праймера ПЦР, ограничивающих участок ДНК с этой заменой внутри. Объем амплификационной смеси – 25 мкл.

Полимеразную цепную реакцию для выявления полиморфизма Val66Met гена BDNF проводили по следующей программе.

При использовании амплификатора «CFX 96» (BioRad, США) выдерживали пробирки при +94°C – 3 мин, затем 40 циклов: при 94°C – 15 с, при 64°C – 40 с. При этом использовали каналы FAM и HEX. Детекция продуктов амплификации осуществлялась на каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала: по каналу FAM – для аллели Val, по каналу HEX – для аллели Met.

Выявление полиморфизма Thr174Met гена AGT проводили с помощью наборов, «СИНТОЛ», Россия. При этом использовали набор реагентов «SNP-Скрин», для выявления полиморфизма Thr174Met гена AGT. Объем амплификационной смеси – 25 мкл.

Полимеразную цепную реакцию для выявления полиморфизма Thr174Met гена AGT проводили по следующей программе.

При использовании амплификатора «CFX 96» (BioRad, США) выдерживали пробирки при +94°C – 3 мин, затем 40 циклов: при 94°C – 15 с, при 64°C – 40 с. При этом использовали каналы FAM и HEX. Детекция продуктов амплификации осуществлялась на каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа построила кривые накопления флуоресцентного сигнала: по каналу FAM – для аллели Thr, по каналу HEX – для аллели Met, при анализе которых

выявлены неблагоприятная аллель М гена BDNF Val66Met, и неблагоприятная аллель Т гена AGT Thr174Met.

Вывод: у пациента Д. выявлены неблагоприятная аллель М гена BDNF Val66Met, характеризующаяся пониженной устойчивостью к стрессу и неблагоприятная аллель Т гена AGT Thr174Met, приводящая к повышенному содержанию ангиотензиногена в плазме, следствием чего явилось развитие ГБ 1 стадии, АГ – 2 степени, риск 1-2 через 6 лет от начала работы в органах ОВД в условиях психоэмоционального стресса.

Пример 2.

Пациент А., 48 лет. Профессия – Сотрудник отряда милиции особого назначения (ОМОН), группа предназначения - 1. Стаж – 20 лет. Работа заключается в обеспечении правопорядка и безопасности, в том числе на массовых акциях и мероприятиях, а также против терроризма. Ежегодно проводились периодические медицинские осмотры, у пациента А. не выявлено развитие гипертонической болезни через 20 лет после начала работы в органах ОВД.

Кровь больного исследовалась заявленным способом: из 100 мкл цельной крови выделяют ДНК сорбент однопробирочным методом с использованием комплекта для выделения "ДНК-сорб-В" (ТУ9398-071-01897593-2008), в соответствии с инструкцией к используемому комплекту.

Из полученного препарата ДНК (объемом 50 мкл) готовили серии разведений в ТЕ-буфере до конечной концентрации (1 ÷ 3) нг/мкл. Данный раствор ДНК использовали для постановки реакции амплификации.

Выявление полиморфизма Val66Met гена BDNF проводили с помощью тест-системы, включающей два зонда типа TagMan, ориентированных на нуклеотидную замену в ДНК, определяющую полиморфизм Val66Met гена BDNF, и два праймера ПЦР, ограничивающих участок ДНК с этой заменой внутри. Объем амплификационной смеси – 25 мкл.

Полимеразную цепную реакцию для выявления полиморфизма Val66Met гена BDNF проводили по следующей программе.

При использовании амплификатора «CFX 96» (BioRad, США) выдерживали пробирки при +94°C – 3 мин, затем 40 циклов: при 94°C – 15 с, при 64°C – 40 с. При этом использовали каналы FAM и HEX. Детекция продуктов амплификации осуществлялась на каждом цикле амплификации. На основании этих данных

управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала: по каналу FAM – для аллели Val, по каналу HEX – для аллели Met.

Выявление полиморфизма Thr174Met гена AGT проводили с помощью наборов, «СИНТОЛ», Россия. При этом использовали набор реагентов «SNP-Скрин», для выявления полиморфизма Thr174Met гена AGT. Объем амплификационной смеси – 25 мкл.

Полимеразную цепную реакцию для выявления полиморфизма Thr174Met гена AGT проводили по следующей программе.

При использовании амплификатора «CFX 96» (BioRad, США) выдерживали пробирки при +94°C – 3 мин, затем 40 циклов: при 94°C – 15 с, при 64°C – 40 с. При этом использовали каналы FAM и HEX. Детекция продуктов амплификации осуществлялась на каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала: по каналу FAM – для аллели Thr, по каналу HEX – для аллели Met, при анализе которых не выявлены неблагоприятная аллель М гена BDNF Val66Met, и неблагоприятная аллель Т гена AGT Thr174Met.

Вывод:

У пациента Д. не выявлена неблагоприятная аллель М гена BDNF Val66Met, характеризующаяся пониженной устойчивостью к стрессу и неблагоприятная аллель Т гена AGT Thr174Met, приводящая к повышенному содержанию ангиотензиногена в плазме. Следствием этого явилось отсутствие развития гипертонической болезни через 20 лет от начала работы в органах ОВД в условиях психоэмоционального стресса.

Таким образом, предлагаемый способ позволяет повысить достоверность прогнозирования риска развития гипертонической болезни у лиц, подвергающихся воздействию психоэмоционального стресса. Это, в свою очередь, позволит своевременно выявлять лиц, предрасположенных к развитию гипертонической болезни среди лиц, подвергающихся психоэмоциональному стрессу на рабочем месте или поступающих на работу в условиях воздействия психоэмоционального стресса, с целью предупреждения развития данной патологии путем рационального трудоустройства вне воздействия психоэмоционального стресса, а также проведения своевременной коррекции и повышения адаптационных способностей организма различными неспецифическими способами.

Предложенный способ может быть использован в клинических, биохимических и молекулярно-генетических лабораториях для прогнозирования риска развития гипертонической болезни у лиц, подвергающихся воздействию психоэмоционального стресса, в процессе проведения диспансеризации или периодических медицинских осмотров большого количества работающих или поступающих на работу в условиях воздействия психоэмоционального стресса.

Формула

Способ прогнозирования риска развития гипертонической болезни у лиц, подвергающихся воздействию психоэмоционального стресса, включающий забор венозной крови, выделение генетического материала, проведение полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами для выявления полиморфизма Thr174Met в гене ангиотензиногена AGT, выявление полиморфизма Thr174Met в гене ангиотензиногена AGT, отличающийся тем, что дополнительно проводят полимеразную цепную реакцию со специфическими праймерами для выявления полиморфизма Val66Met в гене нейротрофического фактора мозга BDNF, далее осуществляют анализ продуктов амплификации методом флуоресцентной детекции в режиме реального времени, при этом выявляют полиморфизм Val66Met в гене нейротрофического фактора мозга BDNF, причем при обнаружении одновременно неблагоприятной аллели М гена BDNF Val66Met и неблагоприятной аллели Т гена AGT Thr174Met прогнозируют высокий риск развития гипертонической болезни у лиц, подвергающихся воздействию психоэмоционального стресса.

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

201900574**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:****A61B 10/00** (2006.01)**G01N 33/48** (2006.01)**C12Q 1/68** (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

A61B 10/00, G01N 33/48, C12Q 1/68Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
ЕАПАТИС, Espacenet, NCBI**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	И.С. ЛУЦКИЙ, М.С. КИШЕНЯ. «АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ ГЕНА AGT С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ ФАКТОРОВ ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА». НАУЧНЫЕ ВЕДОМОСТИ, Серия: Медицина. Фармация. 2017. № 19 (268), выпуск 39. https://www.bsu.edu.ru/upload/iblock/2f3/Medicsina_Farmatsia.pdf	1
Y	RONG JIANG et al. «Brain-Derived Neurotrophic Factor rs6265 (Val66Met) Polymorphism Is Associated with Disease Severity and Incidence of Cardiovascular Events in a Patient Cohort». Am Heart J. 2017 August ; 190: 40–45. doi:10.1016/j.ahj.2017.05.002. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5635658/	1
Y	СТРАМБОВСКАЯ Н.Н. и др. «ИШЕМИЧЕСКИЙ ИНСУЛЬТ – ЗАБОЛЕВАНИЕ С ВЫСОКОЙ СТЕПЕНЬЮ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ». ЭНИ Забайкальский медицинский вестник, № 1/2019. http://zabmedvestnik.ru/journal/2019/1/11.pdf	1
Y	ЛЕВАШОВА О.А., ЗОЛКОРНЯЕВ И.Г. «АНАЛИЗ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ РЕНИН-АНГИОТЕНЗИНОВОЙ СИСТЕМЫ, СИНТАЗЫ ОКСИДА АЗОТА И ФОЛАТНОГО ЦИКЛА У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ». Молекулярная диагностика 2017. Том 2, с. 135-137. https://kpfu.ru/staff_files/F1634184337/Tom_2_s_oblozhkoj.pdf	1

 последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

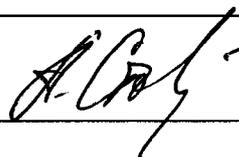
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **17/06/2020**

Уполномоченное лицо:

Заместитель начальник Управления экспертизы

Начальник отдела химии и медицины


 А.В.Чебан