



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/58 (2019.05); C12Q 1/6806 (2019.05); C12Q 1/6827 (2019.05); C12Q 1/686 (2019.05); C12Q 2531/113 (2019.05); C12Q 2561/113 (2019.05); C12Q 2600/156 (2019.05)

(21)(22) Заявка: 2018142928, 04.12.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
04.12.2018

Дата регистрации:
03.07.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 04.12.2018

(45) Опубликовано: 03.07.2019 Бюл. № 19

Адрес для переписки:

614045, г. Пермь, ул. Монастырская, 82, ФБУН
"ФНЦ медико-профилактических технологий
управления рисками здоровью населения"

(72) Автор(ы):

Долгих Олег Владимирович (RU),
Зайцева Нина Владимировна (RU),
Аликина Инга Николаевна (RU),
Кривцов Александр Владимирович (RU),
Гусельников Максим Анатольевич (RU),
Мазунина Алена Александровна (RU),
Никоношина Наталья Алексеевна (RU),
Челакова Юлия Александровна (RU),
Мухачева Елена Александровна (RU),
Вдовина Надежда Алексеевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное бюджетное учреждение науки
"Федеральный научный центр
медико-профилактических технологий
управления рисками здоровью населения"
Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия
человека (ФБУН "ФНЦ
медико-профилактических технологий
управления рисками здоровью населения")
(RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2661604 C1, 17.07.2018. RU
2505814 C1, 27.01.2014. AHMETOV I.I. et al.
Sports genomics: Current state of knowledge
and future directions. Cellular and Molecular
Exercise Physiology. 2012; 1(1): e1.

(54) Способ прогнозирования риска развития у мужчин эссенциальной гипертензии, ассоциированной с ожирением

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины. Предложен способ прогнозирования риска развития у мужчин эссенциальной гипертензии, ассоциированной с ожирением. Из пробы буккального эпителия выделяют ДНК, проводят генотипирование полиморфизма генов рецепторов, активируемых пероксисомными

пролифераторами: PPARA, PPARG и PPARGC1A. При наличии вариантного гомозиготного или гетерозиготного генотипов гена PPARA (rs4253778), гена PPARG (rs1801282) и гена PPARGC1A (rs8192678) прогнозируют риск развития у мужчин эссенциальной гипертензии, ассоциированной с ожирением. Изобретение

обеспечивает достоверное прогнозирование риска развития у мужчин эссенциальной гипертензии, ассоциированной с ожирением, за счет использования в качестве диагностических

критериев совокупности генетических вариантов локусов rs4253778 PPARA, rs1801282 PPARG и rs8192678 PPARGC1A. 1 табл., 2 пр.

R U 2 6 9 3 4 6 9 C 1

R U 2 6 9 3 4 6 9 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G01N 33/58 (2006.01)
C12Q 1/686 (2018.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G01N 33/58 (2019.05); *C12Q 1/6806* (2019.05); *C12Q 1/6827* (2019.05); *C12Q 1/686* (2019.05); *C12Q 2531/113* (2019.05); *C12Q 2561/113* (2019.05); *C12Q 2600/156* (2019.05)

(21)(22) Application: **2018142928, 04.12.2018**

(24) Effective date for property rights:
04.12.2018

Registration date:
03.07.2019

Priority:

(22) Date of filing: **04.12.2018**(45) Date of publication: **03.07.2019 Bull. № 19**

Mail address:

**614045, g. Perm, ul. Monastyrskaya, 82, FBUN
"FNTS mediko-profilakticheskikh tekhnologij
upravleniya riskami zdorovyu naseleniya"**

(72) Inventor(s):

**Dolgikh Oleg Vladimirovich (RU),
Zajtseva Nina Vladimirovna (RU),
Alikina Inga Nikolaevna (RU),
Krivtsov Aleksandr Vladimirovich (RU),
Guselnikov Maksim Anatolevich (RU),
Mazunina Alena Aleksandrovna (RU),
Nikonoshina Natalya Alekseevna (RU),
Chelakova Yuliya Aleksandrovna (RU),
Mukhacheva Elena Aleksandrovna (RU),
Vdovina Nadezhda Alekseevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe byudzhethoe uchrezhdenie nauki
"Federalnyj nauchnyj tsentr
mediko-profilakticheskikh tekhnologij
upravleniya riskami zdorovyu naseleniya"
Federalnoj sluzhby po nadzoru v sfere zashchity
prav potrebitel'j i blagopoluchiya cheloveka
(FBUN "FNTS mediko-profilakticheskikh
tekhnologij upravleniya riskami zdorovyu
naseleniya") (RU)**

(54) **METHOD FOR PREDICTION OF MEN'S RISK OF ESSENTIAL HYPERTENSION ASSOCIATED WITH OBESITY**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine. DNA of buccal epithelium is sampled, polymorphism of receptor genes activated by peroxisomal proliferators: PPARA, PPARG and PPARGC1A. If observing variant homozygous or heterozygous genotypes of PPARA gene (rs4253778), PPARG gene (rs1801282) and PPARGC1A gene (rs8192678), a risk of developing essential hypertension associated with obesity in men.

Invention provides reliable prediction of the risk of developing essential hypertension associated with obesity in men by using a combination of genetic variants of loci as diagnostic criteria rs4253778 PPARA, rs1801282 PPARG and rs8192678 PPARGC1A.

EFFECT: what is presented is a method for prediction of men's risk of essential hypertension associated with obesity.

1 cl, 1 tbl, 2 ex

Изобретение относится к области медицинской диагностики и терапии, и может быть использовано для прогнозирования риска развития у мужчин гипертонической болезни, ассоциированной с ожирением.

Такие социально-значимые заболевания, как гипертоническая болезнь (ее еще называют эссенциальная гипертензия, далее - ЭГ) и ожирение, являются мультифакторными патологиями, в основе которых лежит сочетание неблагоприятных аллелей ряда генов и действия факторов внешней среды [Баранов В.С. Генетический паспорт - основа индивидуальной и предиктивной медицины. СПб.: Изд-во Н-Л, 2009. 528 с.].

Объединяющими патогенетическими механизмами ЭГ и ожирения являются нарушение липидного и углеводного обмена, дисбаланс в системе «протеолиз-антипротеолиз», активация системной воспалительной реакции [Мазуров В.И., Шавловский М.М. // Медицинский академический журнал. 2006. Т. 6. №1. С. 73-83].

Эссенциальная гипертензия является независимым предрасполагающим фактором для многих сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе ишемической болезни сердца, инсульта, сердечной недостаточности и инфаркта миокарда. Среди взрослого населения России распространенность ЭГ составляет более 40 процентов, [Артериальная гипертензия и гипертоническая болезнь [текст] / Е.Е. Гогин // Терапевтический архив - 2010. - №82 (4). - С. 5-10; 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension [Text] / G. Mancia, R. Fagard, K. Narkiewicz [et al.] // J. Hypertens. - 2013. - Vol. 31. - №7. - P. 1281-1357]. Установленными факторами риска развития ЭГ являются избыточная масса тела, дислипидемия, вредные привычки, низкая физическая активность, предпочтение к жирной и соленой пище [И.Е. Чазова, Е.В. Ощепкова, Ю.В. Жернакова «Рекомендации по диагностике и лечению артериальной гипертензии» // Кардиологический вестник. - 2015. - №1. - С. 3-30].

Эссенциальная артериальная гипертензия считается комплексным заболеванием, наряду со средовыми факторами риска в ее формирование вносят вклад и генетические факторы - вовлеченность последних варьирует в различных популяциях в диапазоне от 30 до 50% [Генетический взгляд на феномен сочетанной патологии у человека [Текст] / В.П. Пузырев // Медицинская генетика. - 2008. - Т. 7. - №9. - С. 3-9; ECM remodeling in hypertensive heart disease [Text] / B.C. Berk, K. Fujiwara, S. Lehoux J. // Clin. Invest. - 2011. - №117 (3). - P. 568-575; Association between ins4436A in 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene and essential hypertension in Polish population / P. Hejduk, A. Sakowicz, T. Pietrucha // Postepy Hig. Med. Dosw. - 2015. - №69. - P. 1245-1250].

Значительная распространенность эссенциальной гипертензии, а также высокая смертность в результате развития осложнений данного заболевания, определяют необходимость установления критериев индивидуального прогнозирования риска развития ЭГ, ассоциированной с абдоминальным ожирением, у мужчин, на основе изучения полиморфных вариантов генов - кандидатов. Поэтому поиск новых диагностических критериев в виде генетических маркерных показателей является актуальной задачей.

Из уровня техники известны два вида критериев, используемых при прогнозировании риска развития эссенциальной гипертензии. Это лабораторные показатели и данные о полиморфизме ряда генов.

Из патента РФ №2549462 известен способ определения фактора риска артериальной гипертензии у женщин с абдоминальным ожирением, согласно которому определяют уровень высокомолекулярного адипонектина и значения уровня высокомолекулярного адипонектина менее 4,6 мкг/мл считают фактором риска артериальной гипертензии.

Чувствительность способа составляет 89,3%, специфичность - 88,1%. Способ позволяет достоверно определить фактор риска развития артериальной гипертензии у женщин с абдоминальным ожирением.

Однако, этот известный способ не позволяет оценить наличие предрасположенности к развитию артериальной гипертензии с абдоминальным ожирением у мужчин, так как не предполагает использование генетического тестирования.

Из области техники известен Способ прогнозирования риска развития артериальной гипертензии, охарактеризованный в патенте РФ №2505814. Известный способ включает учет возраста, группы крови систем резус и MN, наличия или отсутствия курения, ожирения, гиперхолестеринемии, злоупотребление солью, массы тела по индексу Кетле, отношения окружности талии к окружности бедер, лабораторные показатели, социальные факторы и вычисление прогностических коэффициентов в баллах, по которым судят о риске развития заболевания.

Однако данный способ не является универсальным, т.к. применим только для коренных жителей Республики Алтай.

Также известен из патента №2624480 Способ прогнозирования риска развития эссенциальной гипертензии на основе комбинаций генов матриксных металлопротеиназ. Данный способ включает выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из периферической венозной крови индивидуумов русской национальности, анализ полиморфизмов генов матриксных металлопротеиназ и прогнозирование высокого риска развития эссенциальной гипертензии при выявлении сочетания генотипа AA rs1320632 MMP-8 и аллеля C rs11225395 MMP-8.

Использование генетических факторов для прогнозирования риска развития эссенциальной гипертензии у женщин известно и из патента РФ №2664428. Этот метод включает выделение ДНК из периферической венозной крови и последующий анализ полиморфизмов генов матриксных металлопротеиназ rs1799750 MMP-1 и rs3025058 MMP-3. А прогнозирование высокого риска развития эссенциальной гипертензии у женщин устанавливается при выявлении сочетания генотипа 1G/1G по локусу rs1799750 MMP-1 и генотипа 6A/6A по локусу rs3025058 MMP-3.

Недостатком указанного метода является то, что в основе развития артериальной гипертензии с абдоминальным ожирением лежат нарушения жирового и углеводного обмена, которые данным способом не учитываются, а предполагаемое данным способом тестирование не обеспечивает диагностику абдоминального ожирения, как фактора формирующего эссенциальную гипертензию.

При этом из уровня техники не были выявлены известные способы прогнозирования риска развития у мужчин эссенциальной гипертензии, ассоциированной с ожирением, поэтому сделать выбор ближайшего аналога к заявляемому объекту не представляется возможным.

Задачей настоящего исследования является расширение арсенала способов диагностики, а именно создание способа прогнозирования риска развития у мужчин эссенциальной гипертензии, ассоциированной с абдоминальным ожирением, на основе комбинаций генов ядерных рецепторов, активирующих пролиферацию пероксисом PPAR.

Технический результат - обеспечение достоверности диагностики прогнозирования риска развития у мужчин эссенциальной гипертензии, ассоциированной с ожирением, за счет использования в качестве диагностических критериев совокупности генетических вариантов локусов rs4253778 PPARA, rs1801282 PPARG и rs8192678 PPARGC1A.

Указанный технический результат достигается предлагаемым Способом

прогнозирования риска развития у мужчин эссенциальной гипертензии, ассоциированной с ожирением, характеризующийся тем, что производят отбор пробы буккального эпителия у мужчин, страдающих ожирением, выделяют из указанной пробы дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), проводят на детектирующем амплификаторе с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени генотипирование полиморфизма генов рецепторов, активируемых пероксисомными пролифераторами: PPARA, PPARG и PPARGC1A, выделяя праймерами участки ДНК для исследования генотипов гена PPARA (rs4253778), гена PPARG (rs1801282) и гена PPARGC1A (rs8192678), устанавливая при этом для каждого из указанных генов одно из следующих его состояний: гетерозиготное, или нормальное гомозиготное, или вариантное гомозиготное, и при наличии вариантного гомозиготного или гетерозиготного генотипов гена PPARA (rs4253778), гена PPARG (rs1801282) и гена PPARGC1A (rs8192678), прогнозируют риск развития у мужчин эссенциальной гипертензии, ассоциированной с ожирением.

Поставленный технический результат обеспечивается за счет следующего.

PPARs рецепторы относятся к особому виду ядерных рецепторов, которые регулируют экспрессию генов в клетке в ответ на связывание со специфическим для данного рецептора лигандом. PPAR расшифровывается как «рецептор, активирующий пролиферацию пероксисом» (англ. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor). Пероксисомы - это широко распространенные внутриклеточные органеллы, с помощью которых клетка избавляется от токсических веществ.

В настоящее время установлено, что функция PPARs рецепторов значительно шире. Они не только активируют пролиферацию пероксисом, но и контролируют обмен углеводов, жиров и белков в клетке, процессы клеточной дифференцировки и апоптоза.

Природными (физиологическими) лигандами этого семейства ядерных рецепторов являются насыщенные и ненасыщенные длинноцепочечные жирные кислоты и некоторые эйкозаноиды.

Идентифицировано 3 типа PPARs: альфа, гамма и дельта (бета).

- α (альфа) - экспрессируется в печени, почках, сердце, мышцах, жировой ткани;
- β/δ (бета/дельта) - экспрессируется во многих тканях, преимущественно в печени, жировой ткани и коже;
- γ (гамма) - экспрессируется в трех формах, вследствие альтернативного сплайсинга: $\gamma 1$ - экспрессируется во всех тканях, включая сердце, поджелудочную железу, селезенку, толстый кишечник.

$\gamma 2$ - большей частью экспрессируется в адипоцитах (состоит из 30 аминокислот).

$\gamma 3$ - синтезируется в макрофагах, толстом кишечнике, белой жировой ткани.

Основная физиологическая роль PPAR α (его еще обозначают PPARA) - реагировать активацией на поступление в печень с кровью жирных кислот (ЖК) и их производных, а также на ксенобиотики, называемые пролифераторами пероксисом (отсюда название рецепторов). Активация PPAR α запускает в гепатоцитах транскрипционные программы захвата, активирования и окисления ЖК в пероксисомах, микросомах и митохондриях, что дает необходимую энергию и ряд субстратов для осуществления всех остальных функций печени. Экспрессируются также гены синтеза липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) и триглицеридов (ТГ). Первые экспортируются в кровь, вторые откладываются в виде внутриклеточных хиломикронов. Дезинтоксикационная функция печени также находится под контролем PPAR α .

Жизненно важная роль PPAR γ (его еще обозначают PPARG) демонстрируется при редком варианте парциальной липодистрофии, названной синдромом резистентности

PPAR γ к действию лигандов. PPAR γ у пациентов с этим дефектом не активируется природными лигандами ЖК, а также тиазолидиндионами (ТЗД). У них отмечается высокий уровень ХВ (хронического воспаления), тяжелая ДЛП (дислиппротеинемия), с увеличением уровня липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) и уменьшением уровня

5 липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), АГ (артериальная гипертензия), гепатостеатоз, раннее развитие АС (атеросклероза), инфаркты миокарда и инсульты (PPAR γ ligand resistance syndrome).

PPAR γ полностью контролирует жировую ткань, начиная от образования адипоцитов и заканчивая процессами захвата, инкорпорации и трансформации ЖК. В печени PPAR γ

10 увеличивает экспрессию генов транспорта и поглощения липидов и ингибирует гены неоглюкогенеза: пируватдегидрогеназу и фосфоенолпируваткарбоксикиназу.

PPARGC1A (коактиватор 1a PPAR γ) в результате воздействия на транскрипционные факторы опосредованно выполняет следующие функции: повышение секреции инсулина и катаболическое воздействие на жировую массу; активацию процессов адаптивного

15 термогенеза; стимуляцию образования митохондрий и усиление окислительных процессов; регуляцию глюконеогенеза и транспорта глюкозы; регуляцию липогенеза и другое.

Благодаря использованию в предлагаемом способе в качестве исследуемого материала буккального эпителия (пробы биологического материала со слизистой щеки),

20 обеспечивается простота и надежность исследований, а также получение нужной информативности в плане выделения из указанной пробы дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) проведения генотипирования полиморфизма указанных генов PPARG, PPARGC1A.

При этом предлагается использовать в качестве праймера участок ДНК rs4253778 гена PPARG, rs1801282 гена PPARG и rs8192678 гена PPARGC1A, устанавливая при этом

25 для каждого гена одно из следующих его состояний: гетерозиготное, или нормальное гомозиготное, или вариантное гомозиготное.

У гена PPARG (rs4253778): G/G - нормальный гомозиготный генотип; G/C - гетерозиготный генотип; C/C - вариантный гомозиготный генотип.

30 У гена PPARG (rs1801282): C/C - нормальный гомозиготный генотип; C/G - гетерозиготный генотип; G/G - вариантный гомозиготный генотип.

У гена PPARGC1A (rs8192678): G/G - нормальный гомозиготный генотип; G/A - гетерозиготный генотип; A/A - вариантный гомозиготный генотип.

Можно предположить, что именно дефекты регуляторных генов, таких как PPARGs, являются причиной каскада метаболических и гормональных нарушений создающих условия, ведущие к атеросклеротическим нарушениям целостности эндотелия сосудов, потери их эластичности и запуску процессов гипертонизации. Поэтому использование их в сочетании в качестве диагностических критериев для установления риска

35 предрасположенности мужчин к эссенциальной гипертензии на фоне абдоминального ожирения является оправданным, но в то же время, неочевидным.

Именно благодаря расширению информационных показателей, связанных с полиморфными вариантами указанных генов, ассоциированных с метаболическими нарушениями липидного и углеводного обменов, и будет обеспечена достоверность прогноза появления риска развития у мужчин эссенциальной гипертензии,

40 ассоциированной с абдоминальным ожирением.

Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод, что поставленный технический результат обеспечивается за счет совокупности операций предлагаемого способа, их последовательности и режимов его реализации.

Из уровня техники (Патент РФ №2646479) известен (http://www1.fips.ru/fips_servl/fip_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2646479&TypeFile=html) Способ определения наследственной предрасположенности человека к спортивной деятельности и оценки рисков для здоровья, при реализации которого применяют 14 генетических критериев, в том числе и гены PPARGC1A 1444G>A (rs8192678), PPARG2 Prol2Ala C>G (rs1801282), PPARG 2528 G>C (rs4253778). Каждому гену придают численное значение в баллах, устанавливают сумму этих значения, по которой судят о наследственной предрасположенности спортсмена к проявлению таких физических качеств, как выносливость, скорость, сила. Однако назначение указанного способа совершенно другое и никак не связано с прогнозированием риска развития у мужчин к эссенциальной гипертензии, ассоциированной с абдоминальным ожирением.

Практические перспективы использования предлагаемого способа заключаются в возможности прогнозировать риск развития гипертонизации мужчин с учетом генотипа, семейного анамнеза, образа жизни, а также в возможности проводить дифференцированную терапию, корректировать питание, физическую активность, совмещая традиционные подходы и использование генетических детерминант.

Предлагаемый способ реализуется следующим образом.

1. Проводят отбор группы мужчин одной этнической популяции в возрасте 26-50 лет. По результатам клинического обследования (вес, рост, индекс массы тела ИМТ, окружность талии) было установлено, что все из них страдают ожирением (ожирение по классификации ВОЗ, 1997 год).

2. У указанных мужчин отбирают пробу буккального эпителия (в виде мазка со слизистой оболочки щеки). После забора материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную пробирку типа «Эппендорф» с 500 мкл транспортной среды (стерильный 0,9%-ный раствор NaCl). Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают.

Далее производят выделение ДНК из пробы. Для этого пробы в количестве 100 мкл лизируют 300 мкл лизирующего раствора, представляющего собой 0,5%-ный раствор саркозила и протеиназы К (20 мг/мл) в ацетатном буфере (pH 7,5). Затем добавляют сорбент (каолин) и последовательными процедурами промывки отмывают фосфатно-солевым буфером (pH 7,2) пробы от белков и смесью изопропиловый спирт : ацетон от липидов. Нуклеиновые кислоты остаются при этом на сорбенте. Далее адсорбированные на сорбенте ДНК из пробы экстрагируют ТЕ-буфером, представляющим собой смесь 10 мМ трис-НСl и 1 мМ ЭДТА (pH 8,0). Экстракт подвергают центрифугированию. После центрифугирования пробирки надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК.

Полученный материал готов к постановке полимеразной цепной реакции (ПЦР). Полимеразную цепную реакцию проводят на детектирующем амплификаторе с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» с использованием готовых наборов праймеров и зондов производства ЗАО «Синтол», Россия, в котором в качестве праймеров использовались участки ДНК гена PPARG (rs4253778), гена PPARG (rs1801282) и гена PPARGC1A (rs8192678).

Проводят реакцию амплификации, это достигается тем, что для исследования аллельного состояния каждого гена у отдельного человека готовят свою реакционную смесь. В каждую пробирку вносят 0,1 мкл готовой смеси праймеров (принятый в генетике термин, обозначающий конечные нуклеотиды с меткой, ограничивающие (отрезающие) амплифицируемую цепочку нуклеотидов гена) и зондов для выбранных генов: гена PPARG (rs4253778), гена PPARG (rs1801282) и гена PPARGC1A (rs8192678), (использованы

Наборы реагентов для определения полиморфизма гена PPARG (rs4253778), гена PPARG (rs1801282) и гена PPARGC1A (rs8192678), ЗАО «Синтол», Россия).

В каждую пробирку добавляют остальные компоненты необходимые для осуществления ПЦР: нуклеотиды (дезоксинуклеозидтрифосфаты: по 10 мМ дАТФ, дТТФ, дГТФ, дЦТФ), буфера (100 мМ трис-НСl-буфера, 500 мМ KCl, 40 мМ MgCl₂) и Tag F-полимеразы. Вносят пробу в количестве 10 мкл. Таким образом, общий объем реакционной смеси составляет 25 мкл. Каждая пробирка плотно закрывается пробкой и устанавливается в амплификатор.

При проведении ПЦР амплификацию и детекцию проводят на детектирующем амплификаторе CFX96 фирмы Bio-Rad.

Используется универсальная программа амплификации, подобранная производителем реактивов. Она включает в себя несколько этапов: 1 этап - активация TaqF-полимеразы (режим «горячего старта») продолжается 15 мин при 95°C; 2 этап - установочные циклы амплификации без измерения флуоресценции (5 циклов); 3 этап - рабочие циклы амплификации с измерением флуоресценции (40 циклов).

Каждый цикл амплификации включает в себя денатурацию ДНК (5 с при 95°C), отжиг праймеров (20 с при 60°C) и саму реакцию полимеризации ДНК (15 с при 72°C).

Регистрация сигнала флуоресценции, возникающего при накоплении продуктов амплификации участков ДНК проводится в режиме «реального времени» после стадии отжига праймеров для выбранных генов по каналу VIC - для детекции одного из аллельных вариантов генов, и по каналу FAM - для альтернативного варианта.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на заданном уровне пороговой линией, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла (N) в соответствующей графе в таблице результатов, отображаемой в программном обеспечении для амплификатора CFX96.

По соотношению пороговых циклов, полученных по двум каналам детекции, определяют состояние гена PPARG в исследуемом участке ДНК (rs4253778), гена PPARG в исследуемом участке ДНК (rs1801282), гена PPARGC1A в исследуемом участке ДНК (rs8192678) (метод аллельной дискриминации). Возможных вариантов состояния гена было два: гомозиготное - в случае, когда одно из значений порогового цикла не определяется (ниже пороговой линии) и гетерозиготное - в случае, когда получено два значения пороговых циклов и по этим каналам получены параболические кривые флуоресценции. В зависимости от того, накопление какого продукта амплификации происходит в реакции, устанавливается гетерозиготное, или нормальное гомозиготное, или вариантное гомозиготное состояние гена PPARG (rs4253778), гена PPARG (rs1801282) и гена PPARGC1A (rs8192678).

3. И при наличии вариантного гомозиготного или гетерозиготного генотипов гена PPARG (rs4253778), гена PPARG (rs1801282) и гена PPARGC1A (rs8192678), прогнозируют риск развития у мужчин эссенциальной гипертензии, ассоциированной с ожирением.

Наличие эссенциальной гипертензии - это когда систолическое артериальное давление (САД) 135 мм рт.ст. и/или диастолическое артериальное давление (ДАД) 85 мм рт.ст. и выше.

Для доказательства достоверности заявляемых критериев диагностики прогнозирования риска развития у мужчин эссенциальной гипертензии, ассоциированной с ожирением, был установлен в каждой группе мужчин САД и ДАД, а также в пробе крови обследованных мужчин определяли уровень триглицеридов и уровень ЛПНП.

Показатель триглицеридов является подтверждающим фактором изменения состояния

эндотелия сосудов и риска формирования атеросклероза и гипертонической болезни.

А уровень ЛПНП является подтверждающим фактором повышения риска развития сердечно-сосудистых заболеваний.

Данные, полученные в результате исследований, приведены в таблице 1.

5 Данные, приведенные в указанной таблице 1, показывают, что при одновременном сочетании вариантного гомозиготного или гетерозиготного генотипов гена PPARG (rs4253778), гена PPARG (rs1801282) и гена PPARGC1A (rs8192678) (пациенты 1-6 с гипертонией), наблюдается эссенциальная гипертония, что доказывается повышенным артериальным давлением САД и ДАД у этой группы мужчин (примечание 2 к таблице 1) и повышением у них в крови по сравнению с физиологической нормой уровня триглицеридов и ЛПНП. А это значит, что при генетической поломке (наличие полиморфизма генов активаторов пероксисом) генов жирового обмена, у такого типа 10 мужчин развивается абдоминальное ожирение и формирование на его фоне имеющейся у данных пациентов эссенциальной гипертонии (примечание 2 к таблице 1).

15 Тогда как при нормальном гомозиготном генотипов указанных генов (пациенты 7, 8) отсутствуют гипертония, абдоминальное ожирение, уровень триглицеридов и ЛПНП находится в пределах физиологической нормы, что доказывает наличие ассоциации нормального гомозиготного генотипа генов активаторов пероксисом с отсутствием ожирения (изменения его лабораторных индикаторных показателей) и развитием 20 эссенциальной гипертонии.

У пациентов 9, 10, имеющих наследование вариантного генотипа только одного из указанных генов, или у пациента 11, который имеет наследование вариантного генотипа только двух из указанных генов, а не одновременно всех трех заявляемых генов вместе, риск развития эссенциальной гипертонии, ассоциированной с ожирением, а также их 25 реализация, не диагностированы, т.к. уровень триглицеридов и ЛПНП находится в пределах физиологической нормы, что указывает на отсутствие необходимых генетических условий для реализации развития эссенциальной гипертонии, ассоциированной с ожирением, то есть измененного полиморфизма всех трех генов одновременно. У этой группы мужчин САД и ДАД находится в пределах нормы 30 (примечание 2 к таблице 1).

Таким образом, это доказывает то, что только одновременное наличие у мужчины, страдающего эссенциальной гипертонией ассоциированной с ожирением, полиморфных генотипов гена PPARG (rs4253778), гена PPARG (rs1801282) и гена PPARGC1A (rs8192678), характеризуется появлением негативных эффектов в виде отклонения от нормы уровня 35 триглицеридов и ЛПНП, характеризующих риск развития эссенциальной гипертонии, и таким образом подтверждается точность и достоверность предлагаемого способа.

Для иллюстрации реализации предлагаемого способа приведены два примера по конкретным пациентам - мужчинам, одного возраста и этнической принадлежности, у первого из которых установлено наличие одновременно трех полиморфных генотипов 40 гена PPARG (rs4253778), гена PPARG (rs1801282) и гена PPARGC1A (rs8192678), а также наличие эссенциальной гипертонии, ассоциированной с абдоминальным ожирением, а у второго пациента - только двух полиморфных генотипов из указанных генов без признаков эссенциальной гипертонии, но имеющего ожирение 2 степени.

Пример 1. Пациент, 37 лет, русский. Установлено наличие вариантного гомозиготного 45 генотипа гена PPARG (rs4253778) - CC, вариантного гомозиготного генотипа гена PPARG (rs1801282) - GG, вариантного гомозиготного генотипа гена PPARGC1A (rs8192678) - AA. САД равен 154 мм.рт.ст.; ДАД равен 94 мм.рт.ст. Содержание триглицеридов - фактора риска формирования ожирения, атеросклероза и

гипертонической болезни - $2,91 \text{ ммоль/дм}^3$, т.е. выше диапазона нормы ($0,3\text{-}1,7 \text{ ммоль/дм}^3$). Содержание липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) - фактора жирового перерождения эндотелия сосудов и риска развития сердечно-сосудистых заболеваний,

5 в т.ч. гипертонической болезни - $4,80 \text{ ммоль/дм}^3$, т.е. выше диапазона нормы ($0\text{-}3,9 \text{ ммоль/дм}^3$). Таким образом, установлены высокие значения уровня триглицеридов и содержания липопротеидов низкой плотности на фоне наличия вариантного гомозиготного полиморфизма генотипов гена PPARG (rs4253778), гена PPARG (rs1801282) и гена PPARGC1A (rs8192678), кодирующих белки ответственные за
10 рецепторы, активирующие пролиферацию пероксисом, контролирующие обмен углеводов, жиров, участвующих в патогенезе формирования ожирения, а в последующем атеросклероза и гипертензии.

Это говорит о том, что, согласно предлагаемому способу, у данного пациента состояние оценивается, как реализация генетического риска развития у мужчин
15 эссенциальной гипертензии, ассоциированной с ожирением.

Пример 2. Пациент, 30 лет, русский. Установлено наличие нормального гомозиготного генотипа гена PPARG (rs4253778) - GG, гетерозиготного генотипа гена PPARG (rs1801282) - CG, нормального гомозиготного генотипа гена PPARGC1A (rs8192678)- GG. Без признаков эссенциальной гипертензии: САД равен 124 мм.рт.ст. ;
20 ДАД равен 74 мм.рт.ст. Содержание триглицеридов - фактора риска формирования ожирения, атеросклероза и гипертонической болезни - $1,12 \text{ ммоль/дм}^3$, т.е. в пределах диапазона нормы ($0,3\text{-}1,7 \text{ ммоль/дм}^3$). Содержание липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) - фактора жирового перерождения эндотелия сосудов и риска развития
25 сердечно-сосудистых заболеваний, в т.ч. гипертонической болезни - $3,57 \text{ ммоль/дм}^3$, т.е. в пределах диапазона нормы ($0\text{-}3,9 \text{ ммоль/дм}^3$). Таким образом, установлены нормальные значения уровня триглицеридов и содержания липопротеидов низкой плотности на фоне наличия нормального гомозиготного генотипов гена PPARG (rs4253778) и гена PPARGC1A (rs8192678), и гетерозиготного генотипа гена PPARG
30 (rs1801282), кодирующих белки ответственные за рецепторы, участвующие в патогенезе формирования ожирения, а в последующем атеросклероза и гипертензии.

Что согласно предлагаемому способу, указывает на отсутствие у данного пациента необходимых генетических условий (наличие полиморфизма всех трех генов) для
35 реализации развития эссенциальной гипертензии, ассоциированной с ожирением.

Таким образом, приведенные данные показывают, что при реализации предлагаемого способа с использованием предлагаемых критериев обеспечивается его назначение.

Заявляемый способ позволяет с достаточной достоверностью прогнозировать риск развития у мужчин эссенциальной гипертензии, ассоциированной с ожирением, по
40 заявляемым генетическим критериям.

Таблица 1

№	Пациент	<i>PPARA</i> <i>rs4253778</i>	<i>PPARG</i> <i>rs1801282</i>	<i>PPARGC1A</i> <i>rs8192678</i>	Триглицериды, ммоль/дм ³	ЛПНП, ммоль/дм ³
1	Пациент, 36 лет	G/C	C/G	G/A	2,36	4,55
2	Пациент, 32 лет	C/C	G/G	A/A	2,77	4,11
3	Пациент, 37 лет	C/C	G/G	A/A	2,91	4,80
4	Пациент, 48 лет	G/C	C/G	G/A	1,99	4,01
5	Пациент, 26 лет	C/C	G/G	A/A	3,24	4,88
6	Пациент, 36 лет	G/C	C/G	G/A	1,79	3,95
Здоровые						
7	Пациент, 37 лет	G/C	C/C	G/G	0,79	3,10
8	Пациент, 30 лет	G/G	C/C	G/G	0,73	2,93
9	Пациент, 26 лет	G/C	C/G	G/G	1,12	3,57
10	Пациент, 36 лет	G/G	C/G	G/G	1,62	3,89
11.	Пациент, 50 лет	G/G	C/G	G/A	1,40	3,72
	норма	G/G	C/C	G/G	0,3-1,7	0-3,9

Примечание: 1. У пациентов 7 и 8 отсутствуют эссенциальная гипертензия и абдоминальное ожирение; у пациентов 1-6 наличие эссенциальной гипертензии и абдоминального ожирения; у пациента 9 отсутствие эссенциальной гипертензии и наличие абдоминального ожирения 1 степени; у пациентов 10-11 отсутствие эссенциальной гипертензии и наличие абдоминального ожирения 2 степени.

2. У пациентов 1-6 - САД 148,1±2,7 мм.рт.ст.; у пациентов 7-11 - САД 117,1±2,1 мм.рт.ст. (достоверность различий между группами $p=0,02$);

У пациентов 1-6 - ДАД 95±1,9 мм.рт.ст.; у пациентов 7-11 - ДАД 77,1±1,1 мм.рт.ст. ($p=0,01$);

3. Ген *PPARA* (rs4253778): G/G - нормальный гомозиготный генотип; G/C - гетерозиготный генотип; C/C - вариантный гомозиготный генотип;

4. Ген *PPARG* (rs1801282): C/C - нормальный гомозиготный генотип; C/G - гетерозиготный генотип; G/G - вариантный гомозиготный генотип.

5. Ген *PPARGC1A* (rs8192678): G/G - нормальный гомозиготный генотип; G/A - гетерозиготный генотип; A/A - вариантный гомозиготный генотип.

(57) Формула изобретения

Способ прогнозирования риска развития у мужчин эссенциальной гипертензии, ассоциированной с ожирением, характеризующийся тем, что производят отбор пробы буккального эпителия у мужчин, страдающих ожирением, выделяют из указанной пробы дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), проводят на детектирующем амплификаторе с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального

времени генотипирование полиморфизма генов рецепторов, активируемых пероксисомными пролифераторами: PPARA, PPARG и PPARGC1A, выделяя праймерами участки ДНК для исследования генотипов гена PPARA (rs4253778), гена PPARG (rs1801282) и гена PPARGC1A (rs8192678), устанавливая при этом для каждого из

5 указанных генов одно из следующих его состояний: гетерозиготное, или нормальное гомозиготное, или вариантное гомозиготное, и при наличии вариантного гомозиготного или гетерозиготного генотипов гена PPARA (rs4253778), гена PPARG (rs1801282) и гена PPARGC1A (rs8192678) прогнозируют риск развития у мужчин эссенциальной гипертензии, ассоциированной с ожирением.

10

15

20

25

30

35

40

45