

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391965** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.08.27

(22) Дата подачи заявки
2023.07.21

(51) Int. Cl. **G01N 33/58** (2006.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)
C12Q 1/6827 (2018.01)
C12Q 1/686 (2018.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)
C12Q 1/6883 (2018.01)
G16H 50/30 (2018.01)

(54) СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РИСКА РАЗВИТИЯ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СВИНЦА И ЕГО СОЕДИНЕНИЙ

(96) **2023000122 (RU) 2023.07.21**
(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,
Безрукавникова Людмила
Михайловна, Анохин Николай
Николаевич, Анварул Нана
Анзоровна, Хохлова Ольга
Владимировна (RU)**

(57) Изобретение относится к медицине и может быть использовано для прогнозирования риска развития артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений. Задачей настоящего изобретения является повышение достоверности прогнозирования риска развития артериальной гипертензии у лиц, подвергающихся воздействию свинца и его соединений, при проведении предварительных и периодических медицинских осмотров большого количества, работающих за короткие (сжатые) сроки времени. Указанная задача достигается тем, что в известном способе прогнозирования риска развития артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений, включающем забор венозной крови, выделение генетического материала, проведение полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами, дополнительно проводят определение полиморфного варианта C521T гена AGT и H63D гена HFE методом флуоресцентной детекции в режиме реального времени, и при одновременном обнаружении неблагоприятной аллели T C521T гена AGT в сочетании с неблагоприятной аллелью G H63D гена HFE прогнозируют высокий риск развития артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений. Техническим результатом изобретения является повышение достоверности прогнозирования риска развития артериальной гипертензии у лиц, подвергающихся воздействию свинца и его соединений, с учетом их индивидуальной чувствительности к воздействию свинца и его соединений, для своевременного предупреждения ее развития путем рационального трудоустройства вне воздействия свинца и его соединений и формирования групп повышенного риска с целью проведения своевременной коррекции для повышения адаптационных способностей организма различными неспецифическими способами. Предлагаемый способ может быть использован в клинических, биохимических, молекулярно-генетических лабораториях, укомплектованных широко используемым оборудованием, выпускаемым отечественной или зарубежной промышленностью.

A1

202391965

202391965

A1

Способ прогнозирования риска развития артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений

Изобретение относится к медицине и может быть использовано для прогнозирования риска развития артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений.

Известен способ прогнозирования риска развития артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений, включающий забор венозной крови, выделение ДНК, проведение полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами, и на основании этого выявление полиморфных вариантов генов ангиотензиногена (AGT) (Hyung-Ki Kim, Hwayoung Lee, Jun-Tack Kwon, Hak-Jae Kim. A polymorphism in AGT and AGTR1 gene is associated with lead-related high blood pressure. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2015 Dec;16(4):712-9. doi: 10.1177/1470320313516174).

Однако, данный способ осуществляет прогнозирование риска развития артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений только на выявлении полиморфных вариантов генов ангиотензиногена (AGT), не учитывая индивидуальной чувствительности к воздействию свинца и его соединений, который оказывает гипертензивный эффект путем активации процессов повышения сосудистого тонуса, эндотелиальной дисфункции и воспаления. Это снижает степень достоверности прогнозирования риска развития артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений, например, при проведении диспансеризации или периодических медицинских осмотров большого количества работающих в ограниченный период времени.

Задачей настоящего изобретения является повышение достоверности прогнозирования риска развития артериальной гипертензии у лиц, подвергающихся воздействию свинца и его соединений, при проведении предварительных и периодических медицинских осмотров большого количества, работающих за короткие (сжатые) сроки времени.

Техническим результатом изобретения является повышение достоверности прогнозирования риска развития артериальной гипертензии у лиц, подвергающихся воздействию свинца и его соединений, с учетом их индивидуальной чувствительности к воздействию свинца и его соединений, для своевременного предупреждения ее развития путем рационального трудоустройства вне воздействия свинца и его соединений 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 артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений, включающем забор венозной крови, выделение генетического материала, проведение полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами, дополнительно проводят определение полиморфного варианта C521T гена AGT и H63D гена HFE методом флуоресцентной детекции в режиме реального времени, и при одновременном обнаружении неблагоприятной аллели T C521T гена AGT в сочетании с неблагоприятной аллелью G H63D гена HFE прогнозируют высокий риск развития артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений.

Предлагаемый способ основан на исследовании комплекса диагностических тестов, при этом наличие неблагоприятной аллели T C521T гена AGT (rs4762) в сочетании с неблагоприятной аллелью G H63D гена HFE (rs1799945) играет важную роль при выявлении наследственной предрасположенности к развитию артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений.

Ген AGT кодирует белок ангиотензиноген, сывороточный глобулин, вырабатываемый клетками печени, из которого под действием ренина образуется ангиотензин I. Однонуклеотидный полиморфизм C521T гена AGT (rs4762) приводит к замене цитозина на тимин в 521 положении, в итоге в белке происходит замена аминокислоты треонин на метионин, в результате чего в плазме повышается уровень ангиотензиногена. Уровень ангиотензиногена может контролировать активность ренин-ангиотензин-альдостероновой системы и ее чрезмерная активация приводит к повышению уровня ангиотензина, что в свою очередь приводит к повышению артериального давления.

Ген HFE расположен на хромосоме 6p21.3, его полиморфный вариант H63D гена HFE (rs1799945) приводит к образованию белка с измененной структурой, что влияет на метаболизм железа в организме, происходит повышенная абсорбция железа и других металлов, в том числе свинца. Повышение содержания свинца в крови приводит к изменению обменной способности кальция, увеличению центральной симпатической активности, повышению уровня катехоламинов в плазме, блокированию Na⁺/K⁺-АТФазы, активации протеинкиназа гладких мышц и повышению активности ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, что приводит к стойкому повышению артериального давления и развитию артериальной гипертензии.

При одновременном обнаружении неблагоприятной аллели T C521T гена AGT (rs4762) в сочетании с неблагоприятной аллелью G H63D гена HFE (rs1799945) прогнозируют высокий риск развития артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений.

Таким образом, предложена совокупность приемов, позволяющих повысить достоверность прогнозирования риска развития артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений, за счет комплексной оценки различных звеньев патогенеза артериальной гипертензии у большого количества работающих в условиях воздействия свинца и его соединений за короткие (сжатые) сроки при проведении предварительных и периодических медицинских осмотров.

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 новизны 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 пациента осуществляют забор венозной крови.

Далее из 100 мкл цельной крови выделяют ДНК с использованием, например, комплекта реагентов для экстракции ДНК СИНТОЛ "S-Сорб" из клинического материала в соответствии с инструкцией к используемому комплекту.

Из полученного препарата ДНК (объемом 50 мкл) готовят серии разведений в элюирующем растворе до конечной концентрации (1÷3) нг/мкл. Данный раствор ДНК используют для постановки полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами.

Выявление полиморфизма C521T гена AGT (rs4762) и полиморфизма H63D гена HFE (rs1799945) проводят с помощью тест системы для определения полиморфизмов генов, методом ПЦР «в режиме реального времени» с флуоресцентной детекцией накопления продуктов амплификации с помощью наборов, например, производства «Синтол», Россия – «SNP-Скрин». Объем амплификационной смеси – 25 мкл. Полимеразную цепную реакцию проводят по следующей программе: при использовании амплификатора «CFX 96» (BioRad, США) выдерживают пробирки при +95°C – 3 мин, затем 40 циклов: при 95°C – 15 с, при 63°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 и HEX.

При одновременном обнаружении неблагоприятной аллели T C521T гена AGT (rs4762) в сочетании с неблагоприятной аллелью G H63D гена HFE (rs1799945) прогнозируют высокий риск развития артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений.

Пример 1.

Пациент А., 47 лет. Профессия – плавильщик на заводе по производству вторичного свинца. Стаж – 6 лет. Работа заключается в ведении процесса плавления и восстановления свинцовых сплавов из свинцовых отходов в плавильно-восстановительной печи. Ежегодно проводились периодические медицинские осмотры, гипертоническая болезнь II ст., 2 ст., риск 3 с повышением АД до 150/100 мм рт.ст. диагностирована после 5 лет работы в условиях воздействия свинца.

Кровь больного исследовалась предлагаемым способом: из 100 мкл цельной крови выделяли ДНК с использованием комплекта реагентов для экстракции ДНК СИНТОЛ "S-Сорб" (Россия) в соответствии с инструкцией к используемому комплекту.

Из полученного препарата ДНК (объемом 50 мкл) готовили серии разведений в элюирующем растворе до конечной концентрации (1÷3) нг/мкл. Данный раствор ДНК использовали для постановки полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами.

Выявление полиморфизма C521T гена AGT (rs4762) проводили с помощью тест системы для определения полиморфизмов генов, методом ПЦР «в режиме реального времени» с флуоресцентной детекцией накопления продуктов амплификации с помощью наборов производства «Синтол», Россия – «SNP-Скрин». Объем амплификационной смеси – 25 мкл. Полимеразную цепную реакцию проводили по следующей программе: при использовании амплификатора «CFX 96» (BioRad, США) выдерживали пробирки при +95°C – 3 мин, затем 40 циклов: при 95°C – 15 с, при 63°C – 40 с. При этом использовали каналы FAM и HEX. Детекция продуктов амплификации осуществлялась на каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строила кривые накопления флуоресцентного сигнала: по каналу FAM для аллели C C521T гена AGT и по каналу HEX для аллели T.

Выявление полиморфизма H63D гена HFE (rs1799945) проводили с помощью тест системы для определения полиморфизмов генов, методом ПЦР «в режиме реального времени» с флуоресцентной детекцией накопления продуктов амплификации с помощью

наборов производства «Синтол», Россия – «SNP-Скрин». Объем амплификационной смеси – 25 мкл. Полимеразную цепную реакцию проводили по следующей программе: при использовании амплификатора «CFX 96» (BioRad, США) выдерживали пробирки при +95°C – 3 мин, затем 40 циклов: при 95°C – 15 с, при 63°C – 40 с. При этом использовали каналы FAM и HEX. Детекция продуктов амплификации осуществляют на каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строила кривые накопления флуоресцентного сигнала: по каналу FAM для аллели С и по каналу HEX для аллели G.

При анализе результатов были выявлены полиморфный вариант C521T гена AGT (rs4762) – С/Т и полиморфный вариант H63D гена HFE (rs1799945) – G/G, что свидетельствует о нарушении экспрессии соответствующих генов, следствием чего явилось развитие артериальной гипертонии.

Вывод: у пациента А. выявлены неблагоприятная аллель Т гена AGT и неблагоприятная аллель G гена HFE, следствием чего явилось развитие артериальной гипертонии через 5 лет работы в условиях воздействия свинца и его соединений.

Пример 2.

Пациент С., 49 лет. Профессия – плавильщик на заводе по производству вторичного свинца. Стаж – 11 лет. Работа заключается в ведении процесса плавления и восстановления свинцовых сплавов из свинцовых отходов в плавильно-восстановительной печи. Ежегодно проводились периодические медицинские осмотры, гипертоническая болезнь не диагностирована после 11 лет работы в условиях воздействия свинца и его соединений.

Кровь больного исследовалась предлагаемым способом: из 100 мкл цельной крови выделяли ДНК с использованием комплекта реагентов для экстракции ДНК СИНТОЛ "S-Сорб" (Россия) в соответствии с инструкцией к используемому комплекту.

Из полученного препарата ДНК (объемом 50 мкл) готовили серии разведений в элюирующем растворе до конечной концентрации (1÷3) нг/мкл. Данный раствор ДНК использовали для постановки полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами.

Выявление полиморфизма C521T гена AGT (rs4762) проводили с помощью тест системы для определения полиморфизмов генов, методом ПЦР «в режиме реального времени» с флуоресцентной детекцией накопления продуктов амплификации с помощью наборов производства «Синтол», Россия – «SNP-Скрин». Объем амплификационной смеси

– 25 мкл. Полимеразную цепную реакцию проводили по следующей программе: при использовании амплификатора «CFX 96» (BioRad, США) выдерживали пробирки при +95°C – 3 мин, затем 40 циклов: при 95°C – 15 с, при 63°C – 40 с. При этом использовали каналы FAM и HEX. Детекция продуктов амплификации осуществлялась на каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строила кривые накопления флуоресцентного сигнала: по каналу FAM для аллели С C521Т гена AGT и по каналу HEX для аллели Т.

Выявление полиморфизма H63D гена HFE (rs1799945) проводили с помощью тест системы для определения полиморфизмов генов, методом ПЦР «в режиме реального времени» с флуоресцентной детекцией накопления продуктов амплификации с помощью наборов производства «Синтол», Россия – «SNP-Скрин». Объем амплификационной смеси – 25 мкл. Полимеразную цепную реакцию проводили по следующей программе: при использовании амплификатора «CFX 96» (BioRad, США) выдерживали пробирки при +95°C – 3 мин, затем 40 циклов: при 95°C – 15 с, при 63°C – 40 с. При этом использовали каналы FAM и HEX. Детекция продуктов амплификации осуществляют на каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строила кривые накопления флуоресцентного сигнала: по каналу FAM для аллели С C521Т гена AGT и по каналу HEX для аллели G H63D гена HFE.

При анализе результатов были выявлены полиморфный вариант H63D гена HFE (rs1799945) – С/С и полиморфный вариант C521Т гена AGT (rs4762) – С/С, соответствующие норме, что свидетельствует о нормальном уровне экспрессии соответствующих генов, следствием чего явилось отсутствие артериальной гипертонии.

Вывод: у пациента С. выявлены аллель С гена AGT и аллель С гена HFE, соответствующие норме, следствием чего явилось отсутствие артериальной гипертонии через 11 лет работы в условиях воздействия свинца и его соединений.

Таким образом, предлагаемый способ позволяет повысить достоверность прогнозирования риска развития артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений в процессе проведения предварительных и периодических медицинских осмотров большого количества работающих за короткие (сжатые) сроки, для предупреждения развития артериальной гипертензии у работающих с генетической предрасположенностью к её развитию, и, следовательно, имеющих повышенный риск развития артериальной гипертензии.

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

Формула изобретения

Способ прогнозирования риска развития артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений, включающем забор венозной крови, выделение генетического материала, проведение полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами, отличающееся тем, что дополнительно проводят определение полиморфного варианта C521T гена AGT и H63D гена HFE методом флуоресцентной детекции в режиме реального времени, и при одновременном обнаружении неблагоприятной аллели T C521T гена AGT в сочетании с неблагоприятной аллелью G H63D гена HFE прогнозируют высокий риск развития артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений.

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

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

Номер евразийской заявки:

202391965А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:
См. дополнительный лист

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
G01N 33/00-33/58, C12Q 1/00-1/6883, G16H 50/00-50/30Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)
Espacenet, EAPATIS, Google, Reaxys

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	KIM Hyung-Ki et al. A polymorphism in AGT and AGTR1 gene is associated with lead-related high blood pressure. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst., 2015 Dec; 16(4): 712-9. Epub 2014 Jul 16, реферат, страница 2, левая колонка, абзац 5, правая колонка, абзацы 3-4, страница 3, левая колонка, абзацы 1-3	1
Y	EA 041770 B1 (ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ "НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МЕДИЦИНЫ ТРУДА ИМЕНИ АКАДЕМИКА Н.Ф. ИЗМЕРОВА" (ФГБНУ "НИИ МТ")) 30.11.2022, формула	1
Y	LAO Jiandong et al. Lead exposure increases blood pressure by increasing angiotensinogen expression. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng., 2016; 51(5): 434-9. страница 434, правая колонка, абзац 1, страница 436, правая колонка, абзац 2, страница 437, левая колонка, абзац 1	1
Y	MAATTA Kirsi M. et al. Genetic variant coding for iron regulatory protein HFE contributes to hypertension, the TAMRISK study. Medicine, 2015 Jan; 94(4): e464, реферат	1
Y	MANI MS. et al. Ecogenetics of lead toxicity and its influence on risk assessment. Human & Experimental Toxicology, 2019; 38(9): 1031-1059, страница 1037, правая колонка, абзац 2, страница 1042, левая колонка, абзац 3, правая колонка, абзац 1	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

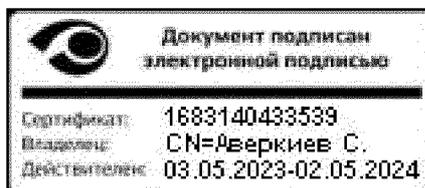
«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«У» - 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: 14 ноября 2023 (14.11.2023)

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы

С.Е. Аверкиев

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

202391965

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

МПК:

G01N 33/58 (2006.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)
C12Q 1/6827 (2018.01)
C12Q 1/686 (2018.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)
C12Q 1/6883 (2018.01)
G16H 50/30 (2018.01)

СПК:

G01N 33/582
C12Q 1/6806
C12Q 1/6827
C12Q 1/686
C12Q 1/6876
C12Q 1/6883
G16H 50/30