

КАРДИОГЕНЕТИКА ТРОМБОФИЛИЯ



КАРДИОГЕНЕТИКА ТРОМБОФИЛИЯ

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМОРФИЗМОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РИСКОМ РАЗВИТИЯ ТРОМБОФИЛИИ, МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ (КАРДИОГЕНЕТИКА ТРОМБОФИЛИЯ). РУ 2010/08414

Болезни органов кровообращения – основная причина инвалидности и преждевременной смерти жителей экономически развитых стран. На сегодняшний день доля этих заболеваний в структуре смертности составляет 40–60 % (примерно 14 миллионов смертей ежегодно). При этом продолжающийся рост заболеваемости и поражение людей все более молодого возраста делает сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) важнейшей медико-социальной проблемой здравоохранения. Показатели смертности от ССЗ в России в 2–4 раза выше, чем в западноевропейских странах, США, Канаде, Австралии, и в настоящее время наблюдается тенденция к росту смертности.

Тромбофилия (от греч. *trhombos* – сгусток и *philia* – склонность) – состояние системы крови, проявляющееся в нарушении гемостаза и склонности к развитию рецидивирующих сосудистых тромбозов (преимущественно венозных) различной локализации и часто возникающее в связи с беременностью, после хирургического вмешательства, травмы или физического перенапряжения. Заболевание обусловлено генетической (у 30–50 % с тромботическим состоянием) или приобретенной патологией клеток крови, а также дефектами свертывающей системы крови.

Структурно в системе гемостаза выделяют: *плазменное звено* (факторы свертывания и образование фибрина – гены **F2, F5, F7, F13, FGB**) и *сосудисто-тромбоцитарное звено* (адгезия тромбоцитов к сосудистой стенке, сокращение сосудов, агрегация тромбоцитов, формирование тромба – гены **ITGA2, ITGB3, PAI-1**). Функционально выделяют системы: *свертывания, противосвертывания (антикоагулянтная) и фибринолиза*.

Наследственная тромбофилия представляет собой предрасположенность к тромбозу вследствие генетических дефектов как свертывающей, так и противосвертывающей (антикоагулянтной и фибринолитической) системы крови.

Генетический анализ позволяет выявить полиморфизмы генов факторов и компонентов системы гемостаза, которые приводят к их аномальному синтезу или нарушению функциональной активности. Это позволяет оценить риски развития сердечно-сосудистой патологии и акушерско-гинекологических осложнений, тромбозов, венозных и артериальных тромбозов. Скрининг генетических особенностей тромбофилий помогает на раннем этапе выявить группу риска и внести соответствующие коррективы в тактику ведения пациентов.

Показания к генетическому анализу:

❖ случаи наследственной тромбозии в семье;

❖ случаи тромбоза в анамнезе:

- единичный тромбоз до 50 лет;
- повторные тромбозы;
- случай тромбоза в любом возрасте при наличии семейного анамнеза;
- тромбозы необычной локализации (портальные, брыжеечные, мозговые вены);
- тромбоз непонятной этиологии после 50 лет;

- ❖ **применение гормональной контрацепции или гормональной заместительной терапии у женщин**, имеющих тромбозы в анамнезе, имеющих родственников I степени родства с диагностированной наследственной тромбофилией или семейный анамнез тромбоэмболических осложнений;
- ❖ **осложненный акушерский анамнез;**
- ❖ **женщины, планирующие беременность**, имеющие тромбозы в анамнезе, имеющие родственников I степени родства с диагностированной наследственной тромбофилией или семейный анамнез тромбоэмболических осложнений;
- ❖ **ситуации высокого риска:**
 - массивные хирургические вмешательства;
 - длительная иммобилизация;
- ❖ **профилактика тромботических осложнений у больных злокачественными новообразованиями.**

Технология анализа генетических полиморфизмов (single nucleotide polymorphisms – SNPs)

В случае возникновения замены в нуклеотидной последовательности ДНК возможно обнаружение трех вариантов генотипа: гомозиготы с исходной последовательностью нуклеотидов, гетерозиготы и гомозиготы с заменой в последовательности нуклеотидов.

Технология **ПЦР с анализом кривых плавления** дает возможность идентифицировать фрагменты ДНК путем детекции изменений в уровне флуоресценции комплекса *фрагмент–проба* (меченный флуорофором олигонуклеотидный зонд) на этапе его денатурации и последующего построения графика кривой плавления.

Технология включает следующие этапы:

- ❖ амплификация искомой последовательности ДНК;
- ❖ гибридизация ампликонов с олигонуклеотидами (*пробами*), мечеными флуорофорами;
- ❖ образование комплементарных и частично комплементарных дуплексов;
- ❖ плавление (денатурация) дуплексов;
- ❖ детекция флуоресценции с последующим построением и анализом кривых плавления.

Для определения нуклеотидной последовательности, образовавшейся в процессе амплификации, используют метод *примыкающих проб* (*kissing probes* или *резонансный перенос энергии*).

В его основе лежит использование двух типов олигонуклеотидов (*проб*), гибридизующихся на матрицу при низкой температуре в непосредственной близости друг от друга. Один из олигонуклеотидов метят флуоресцентным донором, другой – акцептором (гасителем). Идентификация нуклеотидной последовательности образца осуществляется в процессе *плавления дуплексов* (результат гибридизации фрагментов ДНК и олигонуклеотидных зондов), которое происходит при последовательном увеличении температуры реакционной смеси.

Преимуществом данного подхода является использование *специфических флуорофоров*, снижающих риск детектирования неспецифических продуктов амплификации, как при использовании интеркалирующих красителей.

Компания «ДНК-Технология» предлагает уникальную технологию выявления и идентификации SNP методом ПЦР с анализом кривых плавления.

Преимуществами данной технологии являются:

- ❖ Использование Taq-полимеразы, блокированной специфическими антителами, на этапе амплификации искомого участка ДНК с праймерами, общими для обоих вариантов последовательности:
 - реализация «горячего старта» без применения парафина;
 - предотвращение неспецифического отжига праймеров;
 - повышение чувствительности комплектов реагентов.
- ❖ Для повышения надежности типирования компания «ДНК-Технология» использует **модификацию метода примыкающих проб**:
 - сиквенс-специфичные типизирующие олигонуклеотиды;
 - одновременная гибридизация с двумя альтернативными типизирующими зондами, меченными различными флуорофорами, что позволяет определять оба варианта искомой последовательности в одной пробирке в отличие от систем с интеркалирующими красителями, где для определения одного SNP необходимо использовать 2 пробирки для разделения аллельных вариантов.
- ❖ **Автоматическое генотипирование и интерпретация результатов в режиме реального времени** с использованием специализированного программного обеспечения.
- ❖ **Возможность визуальной интерпретации результатов** за счет определения разницы температур плавления не менее 4–5 °С для аллельных вариантов одного гена.

Компания «ДНК-Технология» разработала набор реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с риском развития тромбофилии, методом ПЦР в режиме реального времени (КардиоГенетика Тромбофилия).

Технические характеристики и состав набора реагентов

Количество тестов в наборе	48 тестов
Формат реагентов	Нераскапанный
Taq-AT-полимераза	1 пробирка (192 мкл)
Масло минеральное	1 флакон (7,68 мл)
ПЦР-буфер	1 флакон (3,84 мл)
Исследуемые полиморфизмы	1 пробирка F2: 20210 G>A – 960 мкл 1 пробирка F5: 1691G>A – 960 мкл 1 пробирка F7: 10976 G>A – 960 мкл 1 пробирка F13: 103 G>T – 960 мкл 1 пробирка FGB: -455 G>A – 960 мкл 1 пробирка ITGA2: 807 C>T – 960 мкл 1 пробирка ITGB3: 1565 T>C – 960 мкл 1 пробирка PAI-1:-675 5G>4G – 960 мкл
Материал для анализа	Цельная кровь
Срок годности	6 месяцев
Температура хранения	+2... +8 °С -20 °С (для Taq-AT-полимеразы)

Технология:

- ПЦР-плавление;
- использование других технологических платформ не допускается.

Реагенты для выделения ДНК:

- ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА;
- ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА.

Минимальное количество ДНК для анализа:

1,0 нг на амплификационную пробирку.

Дополнительные реагенты:

реагенты для контроля качества ДНК (КВМ) – для детектирующего амплификатора ДТ-322.

Для проведения анализа необходимы следующие расходные материалы и оборудование:

- микропробирки (или микропробирки в стрипах) объемом 0,2 мл для ПЦР-анализа, адаптированные для работы с термоциклером в режиме реального времени;
- штатив и насадка на микроцентрифугу (вортекс) для стрипованного пластика.

Преимущества использования набора реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с риском развития тромбофилии, методом ПЦР в режиме реального времени:

- технологичность (стандартные методики ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени);
- высокая скорость (для определения генотипа пациента требуется не более суток);
- автоматическая выдача результатов (для приборов серии ДТ);
- низкая стоимость анализа;
- высокая чувствительность (технология позволяет достоверно отличать аллельные состояния гена друг от друга);
- одновременная детекция – в одной пробирке определяются два аллельных варианта гена;
- внутренний контроль (ВК) – позволяет оценить количество ДНК в амплификационной пробирке и исключить ошибки генотипирования.

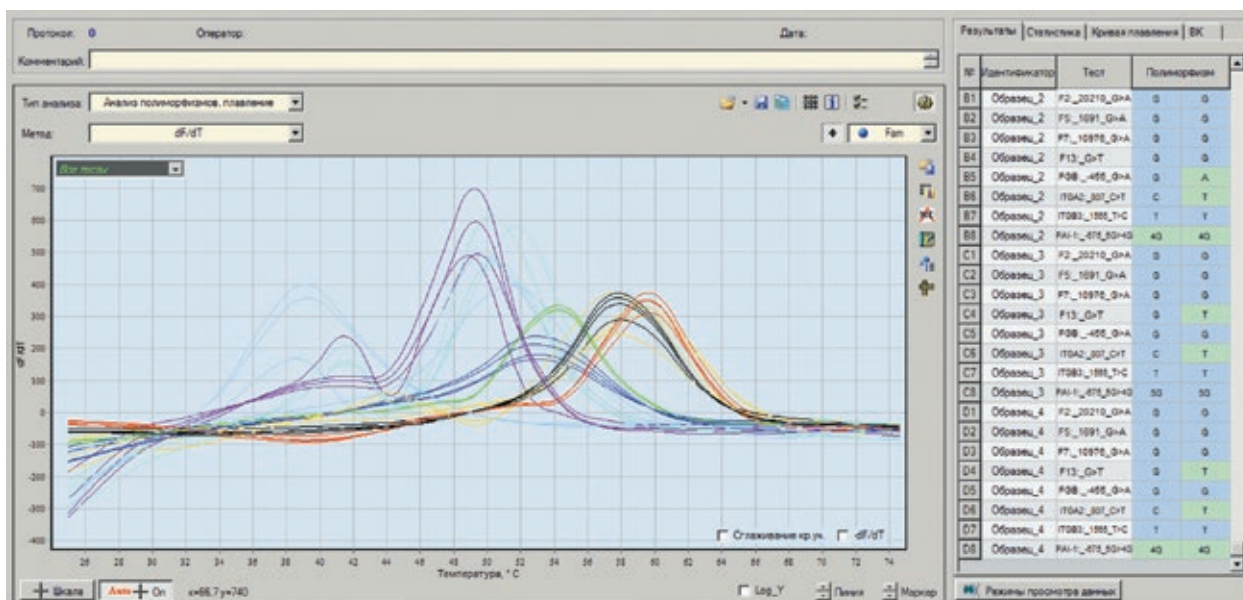
Оборудование, необходимое для проведения анализа

Набор реагентов предназначен для использования в лабораториях, оснащенных **детектирующими амплификаторами для ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (приборы серии ДТ производства ООО «НПО ДНК-Технология»):** ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96 (для ДТ-322 функция контроля количества ДНК в каждой пробирке не поддерживается) (рис. 1).



Рис. 1. Приборы производства компании «ДНК-Технология»

Приборы **серии ДТ** оснащены специально разработанным русскоязычным программным обеспечением, поддерживающим **автоматическую** обработку данных и выдачу результатов исследования в удобной для интерпретации форме. Уникальные технические характеристики приборов позволяют сократить время амплификации до 1 часа 20 минут, а общее время проведения анализа – до 2 часов 30 минут. Это значительно экономит время исследования и обеспечивает высокую пропускную способность лаборатории.



Кроме того, программа позволяет выдавать результаты в **удобной** и **наглядной** форме для анализа полученных данных врачами-клиницистами.

№	Наименование исследования	Результаты	
			Ср
1	F2:_20210_G>T	G G	29,5
2	F5:_1691_G>A	G G	28,0
3	F7:_10976_G>A	G G	28,0
4	F13:_G>T	G G	28,5
5	FGB:_-455_G>A	G A	29,5
6	ITGA2:_807_C>T	C T	29,0
7	ITGB3:_1565_T>C	T T	28,5
8	PAI-1:_-675_5G>4G	4G 4G	29,5

Дополнительные исследования

Ген	Исследование
F2	Протромбиновый индекс (ПТИ) Международное нормализованное отношение (МНО) Протромбиновое время Тромбоэластограмма
F5	Протеин С Протеин S Определение уровня антитромбина III Тромбоэластограмма
F7	Тромбоэластограмма
F13	Тромбоэластограмма
FGB	Определение фибриногена Тромбиновое время (укорочение) Тромбоэластограмма
PAI-1	Определение концентрации ингибитора активации плазминогена Тромбоэластограмма
ITGA2-α2	Определение количества тромбоцитов Тесты на агрегацию тромбоцитов
ITGB3-β3	Определение количества тромбоцитов Тесты на агрегацию тромбоцитов

Генетические полиморфизмы, ассоциированные с риском развития тромбофилии

Ген	Функция гена	Полиморфизм	Идентификатор *	Возможные генотипы	Ассоциации/эффекты
F2 – протромбин (фактор II свертывания крови)	Кодирует предшественник тромбина, стимулирующего образование тромба	20210 G>A	rs1799963	G/G	Без особенностей
				G/A	Повышенная экспрессия гена. Уровень протромбина в плазме увеличен на 30 %
				A/A	
F5 – проакцелерин (фактор V свертывания крови)	Кодирует белковый кофактор при образовании тромбина из протромбина	1691G>A (Arg506Gln)	rs6025	G/G	Без особенностей
				G/A	Резистентность к активированному протеину C
				A/A	
F7 – проконвертин, или конвертин (фактор VII свертывания крови)	Кодирует белок, который участвует в образовании тканевой протромбиназы и превращении протромбина в тромбин	10976 G>A (Arg353Gln)	rs6046	G/G	Без особенностей
				G/A	Понижение уровня конвертина в крови на 30 %
				A/A	
F13A1 – фибриназа (фактор XIII свертывания крови)	Кодирует фактор, который обуславливает димеризацию и полимеризацию фибрина, обладающего значительной механической силой и резистентностью к протеолитической деградации плазмином. Участвует в стабилизации клеточной поверхности мембран	103 G>T (Val135Leu)	rs5985	G/G	Без особенностей
				G/T	Снижение уровня фибриназы в крови
				T/T	

Ген	Функция гена	Полиморфизм	Идентификатор *	Возможные генотипы	Ассоциации/эффекты
FGB – фибриноген (фактор I свертывания крови)	Кодирует предшественник фибрина, который полимеризуется и образует основу фибринового тромба	-455 G>A	rs1800790	G/G	Без особенностей
				G/A	Постоянно увеличенная экспрессия гена, приводящая к повышению на 10-30 % уровня фибриногена в крови
				A/A	
ITGA2- α 2 – интегрин (тромбоцитарный рецептор к коллагену)	Кодирует специализированный рецептор тромбоцитов, обеспечивающий взаимодействие тромбоцитов с поврежденной стенкой сосудов, что является необходимым условием включения последующих звеньев свертывающей системы крови	807 C>T (F224F)	rs1126643	C/C	Без особенностей
				C/T	Изменение первичной структуры субъединицы вызывает изменение свойств рецепторов и отмечается увеличение скорости адгезии тромбоцитов
				T/T	
ITGB3- β 3 – интегрин (тромбоцитарный рецептор фибриногена)	Кодирует субъединицу рецептора мембраны тромбоцитов (GPIIb/IIIa) для фибриногена и фактора Виллебранда и компонента интегрина α v β 3. Играет важную роль в агрегации тромбоцитов и отвечает за адгезию тромбоцитов к субэндотелиальным структурам	1565 T>C (L33P)	rs5918	T/T	Без особенностей
				C/T	Изменение структуры белка и пространственной ориентации лиганд связывающего участка. Повышение сродства к фибриногену, повышенная адгезия клеток, более интенсивная ретракция фибринового сгустка
				C/C	

Ген	Функция гена	Полиморфизм	Идентификатор *	Возможные генотипы	Ассоциации/эффекты
PAI-1 – серпин (антагонист тканевого активатора плазминогена)	Кодирует витамин K-зависимый протеолитический фермент (сериновая протеаза), который активируется под действием тромбина. При этом он превращается в активированный протеин C, который способен связываться с протеином S и расщеплять факторы коагуляции Va и VIIIa	-675 5G>4G	rs1799889	5G/5G 5G/4G 4G/4G	Без особенностей Повышение уровня PAI-1 в крови, снижение фибринолитической активности крови

Внимание! Информация, содержащаяся в рекламном буклете, может не совпадать с актуальной версией спецификации на указанный продукт



Контакты офиса:

ООО «ДНК-Технология» Адрес: Москва, Варшавское шоссе, д. 125 Ж, корп. 6
Тел./факс: (495) 980-45-55 www.dna-technology.ru, mail@dna-technology.ru

Телефон горячей линии:

8 800 200-75-15 (звонок по России бесплатный)