



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/49 (2018.02)

(21)(22) Заявка: 2017126444, 21.07.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.07.2017

Дата регистрации:
18.04.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 21.07.2017

(45) Опубликовано: 18.04.2018 Бюл. № 11

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

Долгих Олег Владимирович (RU),
Зайцева Нина Владимировна (RU),
Кривцов Александр Владимирович (RU),
Казакова Ольга Алексеевна (RU),
Дианова Дина Гумаровна (RU),
Отавина Елена Алексеевна (RU),
Безрученко Надежда Владимировна (RU),
Гусельников Максим Анатольевич (RU),
Перминова Ирина Владимировна (RU),
Мазунина Алена Александровна (RU),
Никоношина Наталья Алексеевна (RU),
Легостаева Татьяна Андреевна (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 2494401 C2, 27.09.2013. EP
0000969015 A2, 05.01.2000. ПЕРКОВСКАЯ
А.Ф. Особенности иммунного статуса детей
в современных экологических условиях
Республики Беларусь. Автореф. дисс. на
соиск. уч. ст. канд. мед. наук// М., 1999, 25 с.
SENKOYLU A. et al. Effect of strontium
ranelate on hydrogen peroxide-induced
apoptosis of CRL-11372 cells / (см. прод.)

(54) Способ выявления нарушений у детей иммунологической реактивности в условиях избыточной экспозиции стронцием

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к педиатрии и иммунологии, и может быть

использовано для выявления нарушения у детей иммунологической реактивности в условиях

избыточной экспозиции стронцием. Для этого проводят отбор пробы крови у ребенка с определением в ней содержания стронция, а также пробы буккального эпителия с выделением дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Затем на детектирующем амплификаторе с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени проводят генотипирование полиморфизма генов TLR4 и HLA-DR, используя в качестве праймера участок ДНК путем исследования генотипов гена TLR4 A8595G (rs1927911) и гена HLA-DR C/T (rs3135388), устанавливая при этом для каждого из указанных генов одно из следующих его состояний: гетерозиготное, или нормальное гомозиготное, или вариантное гомозиготное. При

одновременном выполнении следующих условий: наличие вариантное гомозиготное или гетерозиготное генотипов гена TLR4 A8595G (rs1927911) и/или гена HLA-DR C/T (rs3135388) и превышении концентрации стронция в крови выше референтного уровня на 20% диагностируют у ребенка наличие нарушений иммунологической реактивности в условиях избыточной экспозиции стронцием. Способ позволяет обеспечить точность оценки влияния стронция на наличие нарушения иммунологической реактивности, с обеспечением возможности в последующем судить о развитии аутоиммунных и атопических состояний у детей уже на ранних стадиях их формирования. 1 табл., 2 пр.

(56) (продолжение):

Biochem Genet., 2008 Apr; 46(3-4), pages 197-205.

RU 2 6 5 1 0 3 8 C 1

RU 2 6 5 1 0 3 8 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
G01N 33/49 (2018.02)

(21)(22) Application: **2017126444**, **21.07.2017**

(24) Effective date for property rights:
21.07.2017

Registration date:
18.04.2018

Priority:

(22) Date of filing: **21.07.2017**

(45) Date of publication: **18.04.2018** Bull. № 11

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

**Dolgikh Oleg Vladimirovich (RU),
Zajtseva Nina Vladimirovna (RU),
Krivtsov Aleksandr Vladimirovich (RU),
Kazakova Olga Alekseevna (RU),
Dianova Dina Gumyarovna (RU),
Otavina Elena Alekseevna (RU),
Bezruchenko Nadezhda Vladimirovna (RU),
Guselnikov Maksim Anatolevich (RU),
Perminova Irina Vladimirovna (RU),
Mazunina Alena Aleksandrovna (RU),
Nikonoshina Natalya Alekseevna (RU),
Legostaeva Tatyana Andreevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe byudzhethnoe 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 DETECTING DISORDERS IN CHILDREN OF IMMUNOLOGICAL REACTIVITY IN CONDITIONS OF EXCESSIVE EXPOSURE TO STRONTIUM**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine, namely to pediatrics and immunology, and can be used to detect impairment in children of immunological reactivity in conditions of excessive exposure to strontium. For this purpose, blood samples are taken from the child with determination of the strontium content in it, as well as samples of buccal epithelium with the release of deoxyribonucleic acid (DNA). Then, genotyping of the polymorphism of the TLR4 and HLA-DR genes is carried out on a detecting polymerase chain reaction (PCR) amplifier in real time, using as a primer a DNA site by examining the genotypes of the TLR4

gene A8595G (rs1927911) and the HLA-DR gene C/T (rs3135388), while establishing for each of these genes one of the following states: heterozygous, or normal homozygous, or variant homozygous. Under simultaneous fulfillment of the following conditions: the presence of variant homozygous or heterozygous genotypes of the gene TLR4 A8595G (rs1927911) and/or the HLA gene-DR C/T (rs3135388) and exceeding the concentration of strontium in blood above the reference level by 20 %, the child is diagnosed with immunological reactivity disorders in conditions of excessive exposure to strontium.

EFFECT: method allows to provide an accurate

estimate of the effect of strontium on the presence of a violation of immunological reactivity, with the possibility of subsequently judging the development of

autoimmune and atopic states in children already at the early stages of their formation.
1 cl, 1 tbl, 2 ex

R U 2 6 5 1 0 3 8 C 1

R U 2 6 5 1 0 3 8 C 1

Изобретение относится к области медицины и биологии, в частности, к исследованиям ксенобиотиков, а именно стронция, вызывающего нарушение иммунологической реактивности у детей, проживающих в районах экологического неблагополучия, и может быть использовано для диагностики и прогнозирования токсического действия стронция на нарушение иммунологической реактивности пациента.

Изобретение может быть использовано для постановки предварительного диагноза как в специализированных клиниках при обследовании пациентов, так и в обычных учреждениях здравоохранения. Результаты указанных обследования необходимы для разработки индивидуальных программ наблюдения и лечения в зависимости от тяжести изменения иммунной системы ребенка, а, кроме того, могут быть использованы при формировании санитарно-гигиенических мероприятий по предупреждению и устранению воздействия вредных химических веществ, обуславливающих формирование избыточной, агрессивной реакции иммунитета у детей.

Следует пояснить, что вследствие воздействия каких-либо внешних факторов, в частности, в результате появления вредных химических веществ в среде обитания, увеличивается вероятность изменения иммунитета в виде модификации иммунной защиты, следствием чего может быть повышение заболеваемости, особенно у детей, в связи с незрелостью адаптивных механизмов организма и иммунной системы.

Для задач ранней диагностики нарушений здоровья, а также для оценки эффективности профилактики и лечения, актуальным является выделение маркерных показателей иммунологического и генетического статуса, которые можно использовать в качестве дополнительных диагностических показателей, характеризующих ответ организма на специфическое средовое окружение.

Для понимания существа вопроса, следует пояснить следующее.

Постоянное многокомпонентное воздействие техногенных химических факторов в промышленно развитых регионах оказывает негативное влияние на здоровье населения, в частности, детское. В последнее десятилетие возникла проблема воздействия стабильного стронция на здоровье в связи с вовлечением в питьевое водоснабжение больших объемов артезианской воды водоносных горизонтов, где содержание стабильного стронция в 2-5 раз превышает предельно-допустимое - 7 мг/л. Стронций, будучи изоформен кальцию и обладая высокой подвижностью, способен блокировать ионные каналы для последнего, воздействовать на кальций-зависимые рецепторы и конкурировать за активные участки белков, не выполняя физиологической функции, что может определить модифицирующее влияние стронция на иммунную регуляцию, в том числе, на изменение иммунной реактивности организма.

Иммунологическая реактивность - способность организма проявлять защитно-иммунологические функции в отношении возбудителей инфекционных болезней и обеспечивать специфический ответ на антигенное воздействие.

При этом экотоксиканты, в частности, стронций, способны нарушать регуляторные функции иммунной системы, что может способствовать нарушению адаптационных возможностей организма, возникновению аутоиммунных состояний. Этим и обусловлена потребность в установлении нарушения иммунологической реактивности, модифицированной стронцием.

Из уровня техники известно, что в настоящее время большинство способов диагностики иммунного состояния основано на использовании в качестве маркеров показателей крови. При этом известно, что при этом в качестве маркерных показателей используют толл-рецепторы, в частности TLR4.

Из уровня техники (Патент РФ №2605381) известен способ измерения клеточно-

опосредованной иммунологической реактивности, согласно которому проводят контактирование образца цельной крови, представляющего собой источник лимфоцитов, с одним или более агентами (в частности, с TLR4), которые усиливают системы приобретенного и врожденного иммунитета. Измерение присутствия или повышения

5 уровня иммунной эффекторной молекулы из иммунных клеток показывает уровень клеточно-опосредованной реактивности у субъекта. Использование указанного изобретения позволяет выявлять иммунные дисфункции путем использования системы цельной крови и объединения стимуляторов, которые усиливают системы

приобретенного и врожденного иммунитета, обеспечивая синергетический эффект.

10 Недостатком указанного способа является то, что он не позволяет установить причину иммунной дисфункции, и не отвечает на вопрос о факторе, который мог бы ее вызвать (инфекционный, химический агент), а также не учитывает наличие генетической предрасположенности, реализация которой и может привести к иммунным нарушениям.

15 Также известно использование в качестве критериев генов TLR4 и HLA-DR при диагностике заболеваний.

Из патента РФ №2587325 известен способ диагностики и прогнозирования развития хронического эндометрита (ХЭ) у женщин репродуктивного возраста по экспрессии toll-like рецепторов в эндометрии, согласно которому с помощью

20 иммуногистохимического окрашивания срезов эндометриальной ткани, по проценту позитивно окрашенных клеток эндометрия в баллах, определяют показатели локального врожденного иммунитета - TLR2, TLR4, TLR9: при одновременном выявлении в эпителиальных клетках эндометрия экспрессии TLR2, TLR4 - 3 и более баллов, TLR9 - 4 и более баллов и при отсутствии морфологических критериев ХЭ диагностируют

25 наличие факторов риска и предрасположенности к развитию ХЭ; при одновременном выявлении в эпителиальных клетках эндометрия экспрессии TLR2, TLR4 - менее 3 баллов, TLR9 - менее 4 баллов и при отсутствии морфологических критериев ХЭ диагностируют отсутствие ХЭ; при одновременном выявлении в эпителиальных клетках эндометрия экспрессии TLR2, TLR4 - 3 и более баллов, TLR9 - 6 баллов и при наличии

30 морфологических критериев ХЭ диагностируют наличие и прогрессирование ХЭ (активация воспалительного процесса в эндометрии); при одновременном выявлении в эпителиальных клетках эндометрия экспрессии TLR2, TLR4 - менее 3 баллов, TLR9 - менее 6 баллов и при наличии морфологических критериев ХЭ диагностируют наличие ХЭ в стадии ремиссии (без активации воспалительного процесса в эндометрии); при

35 одновременном выявлении в эпителиальных клетках эндометрия экспрессии TLR2 - 3 и более баллов, TLR4 - 5 и более баллов, TLR9 - 6 баллов и при наличии морфологических критериев ХЭ диагностируют наличие длительно существующего ХЭ, течение которого характеризуется развитием склеротических изменений сосудов и фиброзом стромы эндометрия различной степени выраженности.

40 Также из патента РФ №2236013 известен способ диагностики ХЭ и характера воспаления, в котором с помощью иммуногистохимического окрашивания срезов эндометриальной ткани определяют показатели местного иммунитета: количество лимфоцитов экспрессирующих маркеры естественных киллерных клеток CD56+, CD16+ и маркеры активации HLA-DR(II)+, и тем самым диагностируют различные варианты

45 течения ХЭ.

Однако недостатком данных методов является то, что исследуются данные показатели (TLR4 и HLA-DR). как факторы местной воспалительной реакции (иммуногистохимия) - хронического эндометрита, тогда как иммунный ответ ассоциирован прежде всего с

клетками крови лейкоцитами (нейтрофилы - TLR4, лимфоциты - HLA-DR). Также не оценивается полиморфность генов, отвечающих за экспрессию белков TLR4 и HLA-DR. Поэтому указанный способ является недостаточно точным.

Из патента РФ №2621155 известен способ оценки у детей влияния стронция на апоптоз, ассоциированный с аллельными вариантами гена FAS. При его реализации производят отбор пробы крови у ребенка, и определяют в пробе содержание стронция, также из указанной пробы крови производят выделение моноклеарных клеток, далее на полученных моноклеарных клетках определяют уровень лимфоцитов, содержащих на мембране рецептор CD95+, также у указанного ребенка отбирают пробу буккального эпителия, осуществляют выделение из указанной пробы дезоксирибонуклеиновой кислоты ДНК, затем на детектирующем амплификаторе с использованием полимеразной цепной реакции ПЦР проводят генотипирование полиморфизма, используя в качестве праймера участок ДНК гена FAS 14405C/T (rs1159120) путем исследования его аллельного состояния, устанавливая при этом для гена FAS одно из следующих его состояний: гетерозиготное, или нормальное гомозиготное, или патологическое гомозиготное, и при одновременном выполнении следующих условий: наличие патологического гомозиготного или гетерозиготного генотипов гена FAS 14405C/T, снижение в крови уровня лимфоцитов, содержащих на мембране рецептор CD95+, в 1,5 и более раз по отношению к нижней границе физиологической нормы указанных лимфоцитов с CD95+ для детей, и при превышении концентрации стронция в крови более, чем в 1,5 раза, по отношению к референтному уровню, оценивают процесс апоптоза у ребенка под влиянием стронция как замедленный, а при отсутствии хотя бы одного из вышеуказанных условий оценивают процесс апоптоза у ребенка под влиянием стронция как нормальный.

Однако указанный известный способ позволяет установить только узкий аспект функционирования иммунной системы организма (гибель клеток), в то время как при установлении нарушения иммунологической реактивности по маркерам полиморфизма генов TLR4 и HLA-DR обеспечивается оценка особенностей генетической предрасположенности состояния факторов активации как врожденного (ген TLR4), так и приобретенного (ген HLA-DR) иммунитета.

При этом из уровня техники не были выявлены известные способы диагностики нарушения иммунологической реактивности под влиянием стронция, поэтому сделать выбор ближайшего аналога к заявляемому объекту не представляется возможным.

Технический результат, достигаемый предлагаемым изобретением, заключается в обеспечении точности оценки влияния стронция на наличие нарушения иммунологической реактивности, с обеспечением возможности в последующем судить о развитии аутоиммунных и атопических состояний у детей уже на ранних стадиях их формирования.

Указанный технический результат достигается предлагаемым Способом выявления нарушений у детей иммунологической реактивности в условиях избыточной экспозиции стронцием, характеризующимся тем, что производят отбор пробы крови у ребенка, и определяют в пробе содержание стронция, также у указанного ребенка отбирают пробу буккального эпителия, осуществляют выделение из указанной пробы дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), затем на детектирующем амплификаторе с использованием полимеразной цепной реакции ПЦР в режиме реального времени проводят генотипирование полиморфизма генов TLR4 и HLA-DR, используя в качестве праймера участок ДНК путем исследования генотипов гена TLR4 A8595G (rs1927911) и гена HLA-DR C/T (rs3135388), устанавливая при этом для каждого из указанных генов

одно из следующих его состояний: гетерозиготное, или нормальное гомозиготное, или вариантное гомозиготное, и при одновременном выполнении следующих условий: наличие вариантного гомозиготного или гетерозиготного генотипов гена TLR4 A8595G (rs1927911) и/или гена HLA-DR C/T (rs3135388), при одновременном превышении

5 концентрации стронция в крови выше референтного уровня на 20%, диагностируют у ребенка наличие нарушений иммунологической реактивности в условиях избыточной экспозиции стронцием.

Поставленный технический результат достигается за счет следующего.

В качестве критерия нарушений иммунологической реактивности в условиях

10 контаминации стронцием рекомендуется использовать гетерозиготные или вариантные (патологические) гомозиготные генотипы гена Toll-подобного рецептора 4 - TLR4 A8595G (rs1927911), фенотипирующего клетки врожденного иммунитета, и гетерозиготные или вариантные гомозиготные генотипы гена HLA-DR C/T (rs3135388), главного комплекса гистосовместимости, ответственные за нарушение

15 иммунологической реактивности и ассоциированные с атопическими и аутоиммунными нарушениями (астма, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, псориаз).

Реализующим или запускающим процесс нарушения иммунологической реактивности служит пероральная (водная) экспозиция стронцием, превышающая его референтный диапазон (0,01-0,077 мг/л).

20 Ген TLR4 A8595G (rs1927911) относится к классу клеточных рецепторов с одним трансмембранным фрагментом, которые распознают консервативные структуры микроорганизмов и активируют клеточный иммунный ответ. TLR4 отвечает за развитие реакций врожденного иммунитета, характеризующихся атопической (аллергической, аутоиммунной) направленностью.

25 Исследование ассоциации SNP (Single nucleotide polymorphism, однонуклеотидный полиморфизм) гена TLR4 с хроническими воспалительными заболеваниями органов дыхания показали его роль в распознавании «паттернов» основных групп вирусов и бактерий, активацией специфического иммунитета, каскада неспецифических базовых воспалительных реакций, вовлеченных в патогенез бронхиальной астмы

30 («Полиморфизмы генов Toll-подобных рецепторов, ассоциированные с наследственной отягощенностью и возрастом манифестации бронхиальной астмы». Вестник Адыгейского государственного университета. Серия 4: Естественно-математические и технические науки Выпуск 1 (133) 2014 Руденко К.А., Тугуз А.Р., Анохина Е.Н., Муженя Д.В.).

Также исследования показали (<http://bjo.bmj.com/content/99/9/1301>), что полиморфизм

35 rs1927911 toll-like рецептора 4 (TLR4) был связан с сахарным диабетом 2-го типа.

В последнее время широко изучались роли полиморфизмов генов, сходных с рецептором (TLR), при атеросклеротических заболеваниях. Анализ подгрупп показал, что полиморфизм TLR4 (rs1927911) был значительно связан с риском церебрального инфаркта в рецессивной модели (95% ДИ 0.46-0.96) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28474755>).

40

Система HLA - главный комплекс гистосовместимости, является большим регионом генома, ответственный за сохранение биологической индивидуальности, играет жизненно важную роль, определяя возможность и выраженность иммунного ответа на каждое конкретное антигенное воздействие, т.е. отвечает за развитие реакций приобретенного

45 иммунитета, характеризующихся агрессивным активационным ответом на экзо- или аутоантигены. Ген HLA (C/T гена HLA-DR (major histocompatibility complex, class II, DR) (rs3135388)) (генетический маркер носительства аллеля HLA-DRB1*15). Известна роль кодируемых им белков в патогенезе рассеянного склероза (РС) и сахарного диабета 1-

го типа (СД1). РС и СД1 характеризуются связью риска развития данных состояний с человеческим лейкоцитарным антигеном (HLA)-ДРВ1*15 с однонуклеотидной заменой (SNP) rs3135388: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=gene+polymorphism+hla+dra+rs3135388>; <http://cyberleninka.ru/article/n/polimorfizm-genov-hla-klassa-ii-i-ctla4-zdorovyh-buryat-i-bolnyh-sahamym-diabetom-1-tipa-v-buryatskoy-respublike>.

Главный комплекс гистосовместимости - единственная генетическая область, последовательно связанная с ревматоидным артритом. Например, для больных с быстрым появлением костных эрозий и внесуставными проявлениями характерен HLA-DRB1*0401 подтип. Минеральная плотность костной ткани уменьшалась с возрастом от 96,7% в группе моложе 30 лет до 15,2% в группе старше 80 лет, что было ассоциировано с аллельным полиморфизмом гена DRB1 комплекса HLA.

Гены HLA-комплекса расположены на коротком плече 6-й хромосомы (6p21). Этот регион занимает область размером до 20 сантиморганид. HLA-комплекс состоит из генов, которые кодируют различные белки, вовлеченные в иммунный ответ. В зависимости от структуры и функций белковых продуктов, HLA-гены подразделяются на 3 большие класса. Наиболее близко расположенный к теломере класс I представлен генами HLA-A, B, C, E, F, G. Эти гены кодируют поверхностные клеточные гликопротеины, представленные на наружной цитоплазматической мембране большинства клеток человека. Лежащие ближе к центромере гены класса II (HLA-DR, DQ и DP) кодируют α- и β-цепи, которые формируют гетеродимеры, экспрессирующиеся на поверхности антигенпрезентирующих клеток, таких как дендритные клетки, макрофаги и В-лимфоциты. Гены класса III кодируют компоненты комплемента (C2, C4, Bf), α- и р-факторы некроза опухолей, белки теплового шока, 21-ОН-гидроксилазу. Для всего HLA характерен выраженный генетический полиморфизм. Генетическая предрасположенность к разному типу иммунного ответа, обусловленная генами HLA класса II, должна реализовываться или в результате непосредственного участия самих продуктов генов HLA, или через сцепленные (то есть находящиеся близко на хромосоме и передающиеся единым блоком) с ними гены, или опосредованно, через более сложные цепочки взаимодействий.

На сегодняшний день есть только единичные исследования, связанные с прояснением этих вопросов. Есть предположения, что сила иммунного ответа может зависеть от плотности пептидов, представленных молекулами МНС (major histocompatibility complex, главный комплекс гистосовместимости) на поверхности АГ (антиген) презентирющей клетки, а плотность может зависеть от силы связывания пептидов с представляющей молекулой. По предположению J. Robinson et al., в пределах комплекса генов МНС могут находиться кандидатные гены, которые могут влиять на иммунный или воспалительный ответ АГ независимым образом, что следует из исследования продукции цитокинов в клеточных культурах от здоровых носителей разных HLA-гаплотипов.

Таким образом, основная физиологическая функция молекул HLA II класса, в отличие от I, в представлении антигенов экзогенного происхождения клетками иммунной системы для запуска иммунного ответа на них. Формирование в процессе эволюции системы генов II класса, выделение их из общих с I классом предковых генов и специализация функции возникли, вероятно, в результате действия факторов окружающей среды.

Нарушение физиологических функций системы HLA лежит в основе большинства патологий человека: от патологии репродукции до таких социально значимых заболеваний, как онкозаболевания, аутоиммунные, инфекционные и другие.

Благодаря тому, что в заявляемом способе в качестве диагностических критериев

предлагается использовать именно ген TLR4 A8595G (rs1927911) и ген HLA-DR C/T (rs3135388), обеспечивается точность исследования, т.к. у ребенка учитывается детерминация нарушений врожденной иммунологической реактивности и/или приобретенной. Генетическая детерминация нарушений врожденного и приобретенного иммунитета формируются условиями проживания родителей ребенка на эндемичной территории (экспозиция стронцием), а сама избыточная экспозиция стронцием в процессе жизни ребенка на этой территории реализует негативную генетическую предрасположенность. Поэтому по этим показателям можно судить о генетически детерминированном характере нарушений иммунологической реактивности и разрабатывать индивидуальные программы диагностики и коррекции.

Благодаря использованию в качестве исследуемого материала пробы крови, а также стандартных методик изучения иммунологических параметров, обеспечивается простота, надежность и доступность исследований, а также получение результатов нужной информативности.

Установление содержания химического контаминанта - стронция, именно в крови обусловлено тем, что кровь является самой гомеостатичной средой (управляемость и регулируемость концентраций составляющих ее компонентов) и единственной, имеющей реферируемые константы в отношении техногенных химических веществ.

Воздействие химических факторов оказывает негативное влияние на регуляторные системы и адаптационные возможности организма, что, в свою очередь, ведет к снижению резистентности, сопротивляемости организма к инфекционным заболеваниям и повышению чувствительности к неинфекционной патологии.

Благодаря использованию в качестве исследуемого материала буккального эпителия (пробы биологического материала со слизистой щеки), обеспечивается простота и надежность исследований, а также получение нужной информативности, в плане выделения из указанной пробы дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и посредством полимеразной цепной реакции (ПНР) проведения генотипирования полиморфизма указанных генов TLR4 и HLA-DR. При этом предлагается использовать в качестве праймера участки ДНК гена TLR4 A8595G (rs1927911) и гена HLA-DR C/T (rs3135388), устанавливая при этом для каждого гена одно из следующих его состояний: гетерозиготное, или нормальное гомозиготное, или вариантное гомозиготное.

У гена TLR4 2 аллеля (1 пара аллелей), А и G (А - дикий или нормальный, G - мутантный или вариантный), причем полиморфные генотипы - AG (гетерозиготный) или GG (вариантный гомозиготный). У гена HLA-DR 2 аллеля (1 пара аллелей) С и Т (С - дикий или нормальный, Т - мутантный или вариантный), причем полиморфные генотипы - СТ (гетерозиготный) или ТТ (вариантный гомозиготный).

Стронций оказывает воздействие на нарушение иммунологической реактивности путем реализации имеющей генетической предрасположенности к развитию атопии (полиморфизм гена TLR4 A8595G rs1927911) и образованием избыточного уровня специфического иммуноглобулина G к стронцию (IgG к стронцию), а также реализации генетической предрасположенности к аутоиммунной агрессии (полиморфизм гена HLA-DR C/T rs3135388) в виде остеопоретических изменений костной ткани с повышением уровня агрессивных цитокинов - RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand).

Таким образом, при оценке влияния стронция на нарушение иммунологической реактивности в предлагаемом способе рекомендуется использовать следующие критерии: наличие вариантного гомозиготного или гетерозиготного генотипов гена TLR4 A8595G (rs1927911) и/или наличие вариантного гомозиготного или гетерозиготного генотипов гена HLA-DR C/T (rs3135388), и превышение концентрации стронция в крови по

отношению к референтному уровню не менее, чем на 20%.

Именно благодаря расширению информационных показателей, связанных с нарушением иммунологической реактивности и одновременно с количеством химического токсиканта - стронция, в крови, и будет обеспечена точность оценки модифицирующего влияния стронция на иммунологическую реактивность.

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

Предлагаемый способ реализуется следующим образом.

1. Выбирают территорию экологического риска, характеризующуюся наличием химических токсикантов, обусловленных экологической средой обитания. Исследования были проведены на территории г. Кунгур, характеризующейся наличием биогеохимической провинции с высоким содержанием стронция в подземных водах, использующихся населением, в частности детским, в качестве питьевой воды.

2. На указанной территории производят отбор группы детей одной этнической популяции. Затем производят отбор пробы крови у обследуемого ребенка в специальные пробирки с антикоагулянтом ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) (0,05М раствор ЭДТА в соотношении 500 мкл крови на 50 мкл антикоагулянта) - для определения содержания стронция, для выделения клеток крови и изучения маркеров клеточной дифференцировки. При этом определение стронция в крови проводят методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой в соответствии с требованиями СТО М. 12-2013 и устанавливают, имеется ли превышение концентрации этого загрязнителя в пробе крови над его референтным уровнем (в примере конкретного осуществления на территории г. Кунгур Пермского края референтным значением по стронцию был показатель равный 0,077 мг/дм³ (Р. Heitland, 2006 г.)).

3. Также у указанного ребенка отбирают пробу буккального эпителия (в виде мазка со слизистой оболочки щеки), причем забор осуществляют сухими стерильными зондами с ватными тампонами вращательными движениями без травматизации после предварительного полоскания полости рта водой. 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). Конец зонда отламывают или отрезают, с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки. 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 использовали участки ДНК генов TLR4

(A8595G rs1927911) и HLA-DR C/T (rs3135388).

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 TLR4 A8595G rs1927911 и HLA-DR C/T rs3135388 (использованы Наборы реагентов для определения полиморфизма A8595G гена TLR4 rs1927911 и полиморфизма C/T гена HLA-DR rs3135388 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-HCl-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 TLR4 в исследуемом участке ДНК A8595G (rs1927911), а также гена HLA-DR в исследуемом участке ДНК C/T (rs3135388) (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 генов TLR4 A8595G (rs1927911) и HLA-DR C/T (rs3135388).

4. И при выполнении следующих условий: наличие вариантного гомозиготного или гетерозиготного генотипов генов TLR4 A8595G (rs1927911) и/или HLA-DR C/T (rs3135388) и при превышении концентрации стронция в крови не менее, чем на 20% выше максимального референтного уровня, диагностируют наличие у ребенка нарушения иммунологической реактивности под влиянием стронция.

В последующем по этому показателю судят о возникновении аутоиммунных и

атопических состояний, как результат нарушения иммунологической реактивности, модифицированной стронцием.

При проведении испытаний по реализации предлагаемого способа выполнено исследование детского населения, проживающего в различных по содержанию стронция в питьевой воде условиях среды обитания. Группу наблюдения составили 26 детей, потребляющих воду с содержанием стабильного стронция в ней, превышающим предельно-допустимую концентрацию до 1.3 раза. Группа контроля - 24 детей, потребляющих воду с допустимым содержанием стронция. Группа наблюдения и контрольная группа были сопоставимы по полу, возрасту, соматической заболеваемости.

Кроме того, для подтверждения точности и достоверности оценки влияния стронция на развитие нарушения иммунологической реактивности предлагаемым способом, схема реализации которого приведена выше, у указанных детей были установлены уровень иммуноглобулина G (далее -IgG) к стронцию и содержание белка RANKL. RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) - мембранный белок, цитокин семейства факторов некроза опухоли, играет важнейшую роль в формировании патологии костной системы, патофизиологии костной ткани при остеопорозе, в патогенезе которого может принимать участие стронций при его избыточном содержании в среде обитания. IgG и мембранный белок RANKL являются маркерами нарушения иммунологической реактивности. Они позволяют достоверно установить наличие атопии (сенсibilизации) к стронцию, как результат нарушенной генетической программы по генам врожденной атопизации (TLR4 A8595G rs1927911), а также проявления аутоиммунной агрессии, как результат нарушенной генетической программы по генам гистосовместимости HLA-DR C/T rs3135388.

Установление уровня IgG проводили по методике: Зайцева Н.В., Беляев Е.Н., Долгих О.В. Способы диагностики сенсibilизации к низкомолекулярным химическим соединениям / Методические рекомендации. - М., 2002. - С. 29.

Установление содержания белка RANKL проводили по методике иммуноферментного теста «Свободный растворимый лиганд рецептора-активатора ядерного фактора каппа б (sRANKL) высокочувствительный (ampli sPANKL human) (набор sRANKL, Biomedica, Австрия)».

Полученные данные приведены в таблице 1.

Данные, приведенные в таблице 1, показывают, что при сочетании вариантного (гетерозиготное или патологическое гомозиготное состояние генотипа) аллеля гена TLR4 A8595G (rs1927911) и/или гена HLA-DR C/T (rs3135388) и концентрации виновного фактора (стронция) выше референтной концентрации (0,077 мг/л) не менее, чем на 20%, наблюдается повышение по сравнению с физиологической нормой уровня IgG к стронцию и повышение содержание белка RANKL. То есть при этом фиксируется реализация стронцием негативной генетической программы у ребенка. Тогда как при допустимом (на уровне референтной концентрации) содержании стронция в крови, даже в условиях наследования вариантного генотипа указанных генов, указанные показатели находятся в пределах физиологической нормы. И, наоборот, в случае превышения содержания стронция в крови не менее, чем на 20% по сравнению с референтным уровнем, но при отсутствии полиморфных изменений указанных генов, уровень IgG к стронцию и содержание белка RANKL также находятся в пределах физиологической нормы. Это указывает на то, что только одновременное превышение содержания стронция в крови по отношению к референтному уровню и наличие полиморфных генотипов генов TLR4 A8595G (rs1927911) и/или гена HLA-DR C/T (rs3135388) характеризуется появлением негативных эффектов в виде отклонения от нормы уровня

IgG к стронцию и RANKL, и таким образом подтверждает точность и достоверность предлагаемого способа.

Для иллюстрации реализации предлагаемого способа приведены два примера по конкретным пациентам одного возраста и этнической принадлежности из группы пациентов с повышенным содержанием стронция в крови и наличием полиморфности генотипа (гетерозиготного и вариантного гомозиготного генотипа) гена TLR4 A8595G (rs1927911) и гена HLA-DR C/T (rs3135388), и превышением Sr в крови не менее, чем на 20% по сравнению с референтным уровнем; с повышенным содержанием стронция в крови и отсутствием полиморфности генотипов гена TLR4 A8595G (rs1927911) и гена HLA-DR C/T (rs3135388).

Пример 1. Пациент, 7 лет, русский. Определяется уровень стронция в крови более чем на 20% выше референтного уровня - 0,169 мг/дм. Определяется наличие вариантного гомозиготного генотипа гена TLR4 A8595G (rs1927911) - GG и гетерозиготного генотипа гена HLA-DR C/T (rs3135388) - CT. Значение содержания IgG к стронцию: 0,55 у.е., т.е. в 5,5 раза выше верхней границы нормы. Содержание белка RANKL - костного цитокина - 79,7 пг/см³, т.е. выше диапазона нормы (5,5-11,5 пг/см³). Таким образом, установлены высокие значения уровня IgG к стронцию и содержания белка RANKL на фоне повышенного по отношению к референтному уровню, более чем на 20% содержания стронция в крови, а также наличие вариантного гомозиготного полиморфизма гена TLR4 A8595G (rs1927911) и гетерозиготного полиморфизма гена HLA-DR C/T (rs3135388), кодирующих белки ответственные за атопию и аутоиммунитет, что указывает на реализацию нарушений иммунологической реактивности у данного пациента, инициированной действием стронция.

Пример 2. Пациент, 8 лет, русский. Определяется уровень стронция в крови более, чем на 20%, выше референтных уровней - 0,149 мг/дм³. Отсутствуют полиморфные (вариантные) аллели гена TLR4 A8595G (rs1927911) и гена HLA-DR C/T (rs3135388). Значение содержания IgG к стронцию: 0,092 у.е. - в диапазоне нормы. Содержание белка RANKL - костного цитокина - 9,88 пг/см³ - не превышает диапазон нормы (5,5-11,5 пг/см³). Таким образом, отсутствии полиморфизма генов TLR4 A8595G (rs1927911) и гена HLA-DR C/T (rs3135388) на фоне повышенного по отношению к референтному уровню, более чем на 20%, содержания стронция в крови, не приводит к развитию негативных эффектов в виде отклонения от нормы уровня IgG к стронцию и RANKL, то есть в отсутствии негативной генетической программы превышение референтной концентрации стронция в крови не формирует развитие атопических и аутоиммунных процессов и не меняет состояние иммунологической реактивности у данного пациента.

Таким образом, приведенные данные показывают, что при реализации предлагаемого способа с использованием предлагаемых критериев по содержанию стронция в крови и вариантов гетерозиготного и вариантного гомозиготного генотипов генов TLR4 A8595G (rs1927911) и/или гена HLA-DR C/T (rs3135388) обеспечивается его назначение.

Предлагаемый способ идентификации нарушения иммунологической реактивности, связанной с водной экспозицией стронцием, позволит установить наличие ранних проявлений атопических, аутоиммунных нарушений, в том числе остеопоротических изменений костной ткани.

Таблица 1. Данные по установлению критериев диагностики нарушения иммунологической реактивности у детей в условиях влияния стронция предлагаемым способом у обследованных групп детей и установления его точности

Пациент	Содержание стронция в крови, мг/л (референтный уровень 0,077 мг/л)	Генотип гена <i>TLR4</i> A8595G (rs1927911), определенного в пробе буккального эпителия	Генотип гена <i>HLA-DR</i> C/T (rs3135388), определенного в пробе буккального эпителия	Уровень IgG к стронцию, у.е (Норма 0-0,1)	Содержание белка RANKL, пг/см ³ (Норма 5,5-11,5)
Пациенты с гетерозиготными и вариантными гомозиготными генотипами гена <i>TLR4</i> (A8595G) (rs1927911) и гена <i>HLA-DR</i> C/T (rs3135388), и превышением Sr в крови не менее, чем на 20% по сравнению с референтным уровнем					
1. (7 лет)	0,219	AG	CT	0,356	32,46
2. (7 лет)	0,169	GG	CT	0,550	79,7
3. (9 лет)	0,170	AG	CT	0,201	21,05
Пациенты с гетерозиготными и вариантными гомозиготными генотипами одного из генов: или гена <i>TLR4</i> (A8595G (rs1927911)), или гена <i>HLA-DR</i> C/T (rs3135388), и превышением Sr в крови не менее, чем на 20% по сравнению с референтным уровнем					
4. (7 лет)	0,093	AG	CC	0,607	18,14
5. (8 лет)	0,259	AA	TT	0,864	16,94
6. (9 лет)	0,107	AG	CC	0,299	20,19
7. (8 лет)	0,106	AA	CT	0,128	12,15
Пациенты с гетерозиготными и вариантными гомозиготными генотипами генов <i>TLR4</i> (A8595G) (rs1927911) и/или <i>HLA-DR</i> C/T (rs3135388), и допустимым содержанием Sr в крови					
8. (9 лет)	0,061	AG	CT	0,085	8,31
9. (8 лет)	0,051	AA	CT	0,10	5,82
10. (7 лет)	0,059	GG	CC	0,09	10,12
Пациенты с нормальными гомозиготными генотипами гена <i>TLR4</i> A8595G (rs1927911) и гена <i>HLA-DR</i> C/T (rs3135388), и высоким уровнем Sr в крови					
11. (7 лет)	0,122	AA	CC	0,049	5,9
12. (8 лет)	0,149	AA	CC	0,092	9,88
Пациенты с нормальными гомозиготными генотипами гена <i>TLR4</i> A8595G (rs1927911) и гена <i>HLA-DR</i> C/T (rs3135388), и допустимым уровнем Sr в крови					
13. (9 лет)	0,055	AA	CC	0,087	7,32
14. (10 лет)	0,085	AA	CC	0,044	5,5

Примечание: 1. AA - нормальный гомозиготный генотип гена *TLR4* (A8595G) (rs1927911); AG - вариантный гомозиготный генотип гена *TLR4* (A8595G) (rs1927911); GG - гетерозиготный генотип гена *TLR4* (A8595G) (rs1927911);

2. CC - нормальный гомозиготный генотип гена *HLA-DR* C/T (rs3135388); CT - гетерозиготный генотип гена *HLA-DR* C/T (rs3135388); TT - вариантный гомозиготный генотип гена *HLA-DR* C/T (rs3135388);

3. Зависимость уровня IgG к стронцию и содержания белка RANKL от концентрации стронция в крови (мг/л) достоверна ($R^2=0,65-0,81$; $p<0,05$), где R^2 - коэффициент детерминации; p - вероятность.

(57) Формула изобретения

Способ выявления нарушений у детей иммунологической реактивности в условиях избыточной экспозиции стронцием, характеризующийся тем, что производят отбор пробы крови у ребенка и определяют в пробе содержание стронция, также у указанного ребенка отбирают пробу буккального эпителия, осуществляют выделение из указанной пробы дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), затем на детектирующем амплификаторе с использованием полимеразной цепной реакции ПЦР в режиме реального времени проводят генотипирование полиморфизма генов TLR4 и HLA-DR, используя в качестве праймера участок ДНК путем исследования генотипов гена TLR4 A8595G (rs1927911) и гена HLA-DR C/T (rs3135388), устанавливая при этом для каждого из указанных генов одно из следующих его состояний: гетерозиготное, или нормальное гомозиготное, или вариантное гомозиготное, и при одновременном выполнении следующих условий: наличие вариантного гомозиготного или гетерозиготного генотипов гена TLR4 A8595G (rs1927911) и/или гена HLA-DR C/T (rs3135388), при одновременном превышении концентрации стронция в крови выше референтного уровня на 20% диагностируют у ребенка наличие нарушений иммунологической реактивности в условиях избыточной экспозиции стронцием.