



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/68 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2017114714, 26.04.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.04.2017

Дата регистрации:
29.05.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 26.04.2017

(45) Опубликовано: 29.05.2018 Бюл. № 16

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),
Кривцов Александр Владимирович (RU),
Бубнова 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)

(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 2180116 C1, 27.02.2002. WO
2011075773A1, 30.06.2011. ЗАЙЦЕВА Н.В. и
др. Особенности иммунологических и
генетических нарушений человека в
условиях дестабилизации среды обитания.
Монография. Пермь : Изд-во Перм. нац.
исслед. политехн. ун-та, 2016. 300 с. FINNEY
O.C. et.al. Phenotypic analysis of human
peripheral blood regulatory T cells (CD4 +
(см. прод.)

(54) Способ выявления нарушений физиологической иммуносупрессии у детей в первом поколении по мужской линии с отягощенной наследственностью в условиях избыточной экспозиции алюминием

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины,
в частности к молекулярно-генетической

диагностике, и раскрывает способ выявления
нарушений физиологической иммуносупрессии у

детей в первом поколении по мужской линии с отягощенной наследственностью в условиях избыточной экспозиции алюминием. Способ характеризуется тем, что используют комбинацию следующих диагностических критериев: генетический критерий гена FOXP3, уровень Т-регуляторных лимфоцитов CD127 и уровень контаминации алюминием выше референтного. При одновременном наличии вариантного гомозиготного или гетерозиготного генотипов гена FOXP3 T(-3499)C у сына и/или у матери, снижение в крови ребенка относительного и абсолютного уровня Т-регуляторных лимфоцитов, на мембране которых отсутствует

рецептор CD127 (CD127⁺), по отношению к нижней границе физиологической нормы и при превышении концентрации алюминия в крови выше референтного уровня, делают вывод о наличии нарушений физиологической иммуносупрессии у ребенка в первом поколении по мужской линии с отягощенной наследственностью в условиях избыточной экспозиции алюминием. Изобретение может быть использовано для идентификации неблагоприятного воздействия алюминия, поступающего из окружающей среды. 1 табл., 2 пр.

(56) (продолжение):

FOXP3 + CD127 lo/-) ex vivo and after in vitro restimulation with malaria antigens // European Journal of Immunol. 2010. Vol. 40, iss. 1. P. 47-60. RU 2564914 C2, 10.10.2015. RU 2613127, 15.03.2017.

R U 2 6 5 5 6 5 8 C 1

R U 2 6 5 5 6 5 8 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11)
(51) Int. Cl.
G01N 33/68 (2006.01)

2 655 658⁽¹³⁾ **C1**

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
G01N 33/68 (2006.01)

(21)(22) Application: 2017114714, 26.04.2017

(24) Effective date for property rights:
26.04.2017

Registration date:
29.05.2018

Priority:

(22) Date of filing: 26.04.2017

(45) Date of publication: 29.05.2018 Bull. № 16

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

Dolgikh Oleg Vladimirovich (RU),
Zajtseva Nina Vladimirovna (RU),
Krivtsov Aleksandr Vladimirovich (RU),
Bubnova 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)

(73) Proprietor(s):

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

(54) **METHOD OF DETECTING DISORDERS OF PHYSIOLOGICAL IMMUNOSUPPRESSION IN CHILDREN IN FIRST GENERATION THROUGH PARENTAL LINEAGE WITH HEREDITARY TAINTED IN CONDITIONS OF ALUMINUM EXCESSIVE EXPOSURE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to the field of medicine, in particular to molecular genetic diagnosis, and discloses a method for detecting disorder of physiological immunosuppression in children in the first generation through parental lineage with hereditary tainted in conditions of aluminum excessive exposure. Method is characterized in that a combination of the following diagnostic criteria is used: the genetic criterion of the FOXp3 gene, level of T-regulatory lymphocytes CD127 and the level of contamination with aluminum above the reference one. At simultaneous presence of variant homozygous or

heterozygous genotypes of the gene FOXp3 T(-3499) C from the son and/or from the mother, decrease in relative and absolute level of T-regulatory lymphocytes in child blood, on the membrane of lymphocytes there is no receptor CD127 (CD127⁻), with respect to the lower limit of the physiological norm and when the concentration of aluminum in the blood exceeds the reference level, make a conclusion about the presence of disorder of physiological immunosuppression in child in the first generation through parental lineage with hereditary tainted in conditions of aluminum excessive exposure.

EFFECT: invention can be used to identify the

negative impact of aluminum coming from the environment.

1 cl, 1 tbl, 2 ex

R U 2 6 5 5 6 5 8 C 1

R U 2 6 5 5 6 5 8 C 1

Изобретение относится к биологическим исследованиям и медицине, в частности, к молекулярно-генетической диагностике, и предназначено для идентификации неблагоприятного воздействия алюминия, поступающего из окружающей среды, в виде нарушения физиологической иммуносупрессии у детей в первом поколении по мужской линии с отягощенной наследственностью (по матери), проживающих на территориях с повышенным содержанием этого элемента в атмосферном воздухе и в питьевой воде.

В настоящее время большое внимание уделяется проблеме изучения влияния вредных химических факторов на формирование здоровья населения. Иммунная система является основной защитной системой организма, которая контролирует поддержание гомеостаза внутренней среды и обеспечивает нормальное функционирование организма в целом.

Под термином «иммуносупрессия» понимается угнетение иммунитета по той или иной причине. Иммуносупрессия бывает физиологической (необходимой в определенных ситуациях для организма), патологической (при различных заболеваниях и патологических состояниях) и искусственной, вызываемой приемом ряда иммуносупрессивных препаратов и/или ионизирующими излучениями.

В рамках настоящей заявки под физиологической иммуносупрессией понимается нарушение индукции физиологических иммуносупрессоров - регуляторных Т-клеток (Т-регуляторные лимфоциты) или CD127⁺, которые контролируют интенсивность иммунного ответа, подавляя активность других субпопуляций Т-лимфоцитов, ингибируя иммунный ответ (Журнал «Клиническая иммунология, аллергология, инфектология», №5 (16), 2008 г.)

В связи с широчайшим использованием химических технологий в различных производственных циклах и сферах человеческой деятельности пристальное внимание ученых и медиков привлекает проблема выявления пороговых критериев, позволяющих на ранних этапах оценить, что воздействие вредного химического вещества превышает компенсаторные возможности организма и наносит вред здоровью человека. Актуальность исследования неблагоприятного воздействия алюминия особенно обусловлена на территориях, вблизи которых размещены предприятия цветной металлургии.

Токсичность алюминия проявляется во влиянии на обмен веществ, в особенности минеральный, на функцию нервной системы, в способности действовать непосредственно на клетки - их размножение и рост. В основе механизма многих проявлений интоксикации лежит действие алюминия непосредственно на ядерный хроматин, а также косвенно - путем замещения других элементов или изменения активности ряда ферментных систем и систем регуляции.

Для задач оценки степени воздействия среды обитания на здоровье, ранней диагностики нарушений здоровья, а также для оценки эффективности профилактики и лечения, актуальным является выделение маркерных показателей изменения иммунного статуса человека под воздействием алюминия, которые могут использовать в качестве индикаторов нарушения гомеостаза и в качестве дополнительных диагностических критериев санитарно-эпидемиологической обстановки.

Иммунная система, являясь основной защитной системой организма, в первую очередь реагирует на воздействие ксенобиальных факторов, поэтому целесообразно оценивать степень воздействия химических токсикантов, в частности, алюминия, основываясь на изменениях со стороны иммунной системы.

Чрезвычайно важной и актуальной на современном этапе становится проблема проявлений воздействия химических токсикантов в последующих поколениях, т.к. в большинстве случаев несколько поколений одной семьи проживают на одной территории

много лет. С проблемой влияния химических веществ на последующие поколения тесно переплетаются вопросы изучения в популяции мутационного груза, характеризующего частоту наследственно обусловленной патологии, связанной с влиянием факторов окружающей среды. Разработка подходов к оценке мутационного груза является одной из основных задач при определении реальной мутагенной нагрузки на население.

Например, из патента РФ №2509374 известен способ оценки генетических морфо-функциональных нарушений у потомства белых крыс с "химическим наследственным грузом", согласно которому исследуют поведение потомства белых крыс, подвергшихся воздействию токсического вещества, с помощью теста «открытое поле». Регистрируют количество актов «обнюхивание», «локомоции», «движения на месте», рассчитывают прогностический индекс по формуле: $p=1/(1+e^{-y})$, где p - прогностический индекс - вероятность наличия генетических изменений; e - математическая константа, равная 2,72; y - регрессионное уравнение: $y=7,04-0,65x_1+1,45x_2-0,64x_3$, где цифровые показатели - константы и регрессионные коэффициенты; x_1 - количество актов «обнюхивание»; x_2 - количество актов «локомоции»; x_3 - количество актов «движение на месте», при p больше 0 и меньше 0,5 вероятность наличия генетических изменений определяют как минимальную, при p больше 0,5 и меньше 1, вероятность генетических изменений оценивают как высокую.

Однако указанный способ предназначен только для изучения мутагенного эффекта у животных в токсикологических экспериментах, а уровень исследования - целостный организм, менее точный, чем молекулярный, генетический.

Из уровня техники известен ряд способов, позволяющих диагностировать различные заболевания при наследственной отягощенности.

Известен способ прогнозирования риска развития гипертонической болезни у индивидуумов, имеющих наследственную отягощенность (Патент РФ №2580310), включающий выделение ДНК из периферической венозной крови методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК, при этом анализируют полиморфизмы генов -308G/A TNF α , +250A/G Lta, +36A/G TNFR1 и прогнозируют:

- повышенный риск развития гипертонической болезни у индивидуумов русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья РФ, имеющих наследственную отягощенность в случае выявления сочетания аллеля -308A TNF α с аллелем +36G TNFR1; - низкий риск развития гипертонической болезни у индивидуумов русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья РФ при выявлении следующих сочетаний: аллеля -308G TNF α с генотипом +250AA Lta или аллеля -308G TNF α с аллелем +250A Lta.

Этот способ предназначен только для прогнозирования риска развития гипертонической болезни.

Еще известен способ прогнозирования риска развития протромботических изменений у подростков с эссенциальной артериальной гипертензией при наследственной отягощенности (Патент РФ №2514887). При реализации этого способа определяют факторы риска развития протромботических изменений у подростков с эссенциальной артериальной гипертензией, а именно: полиморфизм C677T гена 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы; полиморфизм A66G гена метионинсинтазы-редуктазы; уровень среднедневного диастолического артериального давления; уровень средненочного систолического артериального давления; индекс времени гипертензии систолического артериального давления в дневное время; показатель отягощенного тромботического генеалогического анамнеза; показатель тромбозов в семье у

родственников в раннем возрасте. На основании оценки совокупности выявленных факторов риска делают вывод либо о благоприятном прогнозе и низкой вероятности развития протромботических изменений, либо о неблагоприятном прогнозе и высокой вероятности развития протромботических изменений.

5 Из патента РФ №2448163 известен способ детекции 17 мутаций генов GJB2 И GJB6 при наследственной несиндромальной глухоте (ННГ). Способ предусматривает детекцию 17 связанных с данным заболеванием мутаций в генах GJB2 и GJB6 с помощью ПЦР-амплификации соответствующих областей этих генов, которую проводят в 8 реакционных смесях с использованием специфических пар праймеров, и последующего
10 анализа полученных ампликонов, проводимого либо без предварительного расщепления эндонуклеазами (при определении мутаций с.312del14, с.333-334delAA, ΔGJB6-D13S1830, ΔGJB6-D13S1854), либо после гидролиза соответствующими специфическими рестриктазами (при определении мутаций IVS1+1G>A, с.35delG, с.71G>A, с.79G>A, с.167delT, с.235delC, с.224G>A, с.299-300delAT, с.360delGAG, с.341A>G, с.269T>C,
15 с.101T>C, с.109G>A). Использование изобретения позволяет получить точный, объективный диагноз наследственной аутосомно-рецессивной потери слуха.

Еще известен еще ряд способов диагностики развития заболеваний по генетическим данным при отягощенной наследственности:

Способ прогнозирования риска формирования хронической истинной экземы у индивидуумов в зависимости от наличия наследственной
20 отягощенности (Патент РФ №2585382);

Способ определения наследственной предрасположенности к заболеваниям (Заявка РФ №94028707);

Способ определения наследственной предрасположенности к сенсibilизации
25 производственными аллергенами (Патент РФ №2564914).

Но все эти известные способы направлены на выявления нарушений конкретных видов заболеваний, а не на выявление нарушений физиологической иммуносупрессии у детей.

Стоит еще упомянуть один известный способ иммунологического мониторинга часто
30 болеющих детей дошкольного возраста с гипертрофией аденоидов и/или аллергией, проживающих на территориях с различными экологическими характеристиками. Согласно этому способу выполняют иммунологическое обследование с определением содержания регуляторных Т-лимфоцитов с фенотипом CD4+CD25+FOXP3+ для ранней диагностики регуляторной иммунологической недостаточности (см. «Характеристика
35 естественных регуляторных Т лимфоцитов и их молекулярного маркера FOXP3 у часто болеющих детей дошкольного возраста, проживающих в условиях воздействия антропогенной нагрузки», Ветрова А.Д., дисс. к.м.н., М., 2013).

Однако в этом способе анализируются только показатели клеточного и гуморального (адаптивного) иммунитета (FOXP3+) без генотипирования полиморфных вариантов
40 гена, отвечающего за его экспрессию, и без определения уровня воздействующего экологического фактора, что не позволяет в полной мере рассчитывать на достоверность выводов.

Из патента РФ №2613127 известен способ оценки дисфункции иммунитета у детей дошкольного возраста с рецидивирующей респираторной инфекцией, проживающих
45 на территориях вокруг химически опасных производств. Проводят отбор проб периферической крови и в лимфоцитах методом полимеразной цепной реакции определяют аллельные варианты A₁A₁ и A₁A₂ гена цитокина ФНОα и его количественное содержание, а также показатели количественного содержания цитокинов

Ил-10, IFN_{γ} и IgA. При аллельном варианте A_1A_1 , содержаниях ФНО α более 30 пг/мл, Ил-10 менее 20 пг/мл, IFN_{γ} менее 12 пг/мл, IgA менее 1 г/л прогнозируют дисфункцию иммунитета на фоне течения рецидивирующей респираторной инфекции. При аллельном варианте A_1A_2 , содержании ФНО α менее 40 пг/мл, Ил-10 более 26 пг/мл, IFN_{γ} более 40 пг/мл, IgA более 1,5 г/л прогнозируют благоприятное течение рецидивирующей респираторной инфекции без развития дисфункции иммунитета. Использование данного способа позволяет проводить иммунологический мониторинг у детей с различными клиническими формами рецидивирующей респираторной инфекции в условиях антропогенной нагрузки.

Однако его недостатком является то, что способ позволяет осуществлять иммунологический мониторинг у детей с узкоспециализированной патологией - рецидивирующая респираторная инфекция, а такие виды патологических состояний как аллергия, заболевания с аутоиммунным механизмом не характеризуются данным перечнем иммунологических и генетических тестов.

Кроме того, авторами не конкретизируется спектр и уровень химических факторов «химически опасных производств», что влечет за собой некоторую неопределенность, т.к. возникновение рецидивирующей респираторной инфекции не может быть ассоциировано со всем спектром экотоксикантов в окружающей среде. Общеизвестно, что конкретные химические вещества способны вызвать конкретное нарушение здоровья человека. Этот недостаток снижает практическую значимость известного способа.

При этом из уровня техники не были выявлены известные способы оценки нарушений у детей физиологической иммуносупрессии, ассоциированной с внешнесредовым воздействием алюминия, поэтому сделать выбор ближайшего аналога к заявляемому объекту не представляется возможным.

Технический результат, достигаемый предлагаемым изобретением, заключается в обеспечении достоверности установления оценки влияния алюминия на нарушение физиологической иммуносупрессии у детей в первом поколении по мужской линии с отягощенной наследственностью по матери, за счет использования новой комбинации диагностических критериев, включающих как генетический критерий гена FOXP3, так и совокупность уровня Т-регуляторных лимфоцитов CD127⁺ и уровня контаминации алюминием выше референтного.

Указанный технический результат достигается предлагаемым Способом выявления нарушений физиологической иммуносупрессии у детей в первом поколении по мужской линии с отягощенной наследственностью в условиях избыточной экспозиции алюминием, заключающийся в том, что производят отбор пробы крови у ребенка-сына в первом поколении и определяют в пробе содержание алюминия, также из указанной пробы крови производят выделение моноклеарных клеток, далее на полученных моноклеарных клетках определяют уровень Т-регуляторных лимфоцитов, на мембране которых отсутствует рецептор CD127 (CD127⁻), затем у указанного ребенка, а также у его матери, отбирают пробу буккального эпителия, осуществляют выделение из указанных проб дезоксирибонуклеиновой кислоты ДНК, на детектирующем амплификаторе с использованием полимеразной цепной реакции проводят генотипирование полиморфизма, используя в качестве праймера участок ДНК гена FOXP3 T(-3499)C, путем исследования его аллельного состояния, устанавливая при этом для гена FOXP3 T(-3499)C 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 FOXP3 T(-3499)C у сына и/или у матери, снижение в крови ребенка относительного и абсолютного уровня Т-регуляторных лимфоцитов, на мембране которых отсутствует рецептор CD127 (CD127⁻), по отношению к нижней

5 границе физиологической нормы указанных Т-регуляторных лимфоцитов CD127⁻ для детей, и при превышении концентрации алюминия в крови ребенка выше референтного уровня, делают вывод о наличии нарушений физиологической иммуносупрессии у ребенка в первом поколении по мужской линии с отягощенной наследственностью в условиях избыточной экспозиции алюминием.

10 Поставленный технический результат достигается за счет следующего.

Механизмы, лежащие в основе высокого риска патологии от хронического воздействия низкой концентрации алюминия относятся, во-первых, к скорости усваивания алюминия организмом, достаточно низкой, чтобы создать впечатление безопасности алюминия в пище и питьевой воде; во-вторых, медленно прогрессирующее

15 проникновение алюминия в мозг в течение длительного периода продромальной стадии (когда симптомы болезни еще не проявились, но уже заметно ухудшение некоторых функций); и в-третьих, сходство алюминия и железа с точки зрения размера ионов позволяет использовать для алюминия известный механизм поглощения железа клетками, ответственными за работу памяти.

20 Потенциальная токсичность алюминия была четко показана, а последние работы убедительно доказывают, что алюминий может быть причиной канцерогенных процессов. Имеются данные о мутагенной активности алюминия. Длительное воздействие низких концентраций алюминия приводит к ускоренному старению мозга и дегенеративным заболеваниям нервной системы (Бонди, 2014).

25 Вот почему раннее выявление специфических, в том числе вариантных последовательностей участков нуклеиновых кислот, ассоциированных с различными заболеваниями, является важной задачей диагностической медицины, решение которой позволит выявлять индивидуальный риск возникновения нарушений здоровья в различных условиях среды обитания.

30 Тем более важно провести подобное исследование генов в ряде поколений, чтобы установить особенности влияния алюминия на здоровье потомства.

В качестве генетического критерия в заявляемом способе предложено использовать полиморфизм T(-3499)C в гене FOXP3. Ген FOXP3 относится к транскрипционным факторам клеточной супрессии. Он функционирует в качестве главного регулятора

35 (фактора транскрипции) в развитии и функционировании регуляторных Т-клеток (Tregs). Регуляторные Т-клетки, как правило, снижают интенсивность иммунного ответа. В болезнях человека, изменения в численности регуляторных Т-клеток - и, в частности, тех, которые отвечают за экспрессию FOXP3 - встречаются в ряде болезненных состояний. Например, пациенты с опухолями имеют локальный относительный избыток FOXP3 положительных Т-клеток, который ингибирует способность организма подавлять

40 образование раковых клеток. С другой стороны, пациенты с аутоиммунными заболеваниями, такими как системная красная волчанка (болезнь Либмана-Сакса), имеют связанную дисфункцию FOXP3 положительных клеток.

В качестве критерия ранних иммунных нарушений в условиях контаминации

45 алюминием в предлагаемом способе рекомендуется использовать измененный генотип транскрипционного фактора FOXP3 фенотипирующего регуляторные Т-лимфоциты как у мам, так и у их сыновей, поскольку ген FOXP3 картирован на X-хромосоме и за его передачу сыновьям несет ответственность исключительно генотип матери. Критерием иммунных нарушений в заявляемом способе также предлагается

использовать фенотип самих регуляторных Т-лимфоцитов по критерию CD127⁺.

Реализующим или запускающим процесс иммунного дисбаланса служит экспозиция алюминия, превышающая референтную концентрацию (референтный уровень алюминия в крови составляет $0,006 \pm 0,004$ мг/дм³).

Подтверждающим фактором клеточной инверсии служит нарастание атопии по критерию содержания IgE, поскольку снижение супрессирующего воздействия Т-рег (CD127⁺) приводит к возникновению аллергических и аутоиммунных реакций.

Таким образом, для установления иммуноопосредованных проявлений угнетения естественной клеточной супрессии, ассоциированной с содержанием алюминия в крови, рекомендуется использование методического подхода, основанного на определении генотипов матери и сына и в случае гетерозиготы и/или вариантной гомозиготы участка гена FOXP3 T(-3499)C и отклонении от физиологической нормы содержания Т-рег лимфоцитов (CD127⁺) в виде дефицита, регистрируют наличие ранних нарушений физиологической иммунносупрессии, связанной с экспозицией алюминием.

Благодаря использованию в качестве исследуемого материала пробы венозной крови, а также стандартных методик изучения таких параметров, как содержание в пробе крови лимфоцитов CD127⁺, обеспечивается простота, надежность и доступность исследований, а также получение результатов нужной информативности.

Установление содержания химического контаминанта - алюминия, 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.

Выделение из пробы крови мононуклеарных клеток обусловлено необходимостью определения в них уровня Т-регуляторных лимфоцитов, не содержащих на своей мембране рецептор CD 127. Это обусловлено тем, что абсолютный и относительный уровень Т-лимфоцитов CD127 являются важнейшим фактором инициации регуляторных механизмов, которые способны активно ингибировать иммунный ответ.

Благодаря использованию в качестве исследуемого материала буккального эпителия у матери и сына (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 (ПЦР) проведения генотипирования полиморфизма используется в качестве праймера участок ДНК гена FOXP3 T(-3499)C путем исследования его аллельного состояния, устанавливая при этом для гена FOXP3 одно из следующих его состояний: гетерозиготное, или нормальное гомозиготное, или вариантное гомозиготное. У гена FOXP3 2 аллеля (1 пара аллелей) С и Т (Т - дикий или нормальный, С - мутантный или вариантный). Нарушение процесса физиологической иммуносупрессии характеризует наличие аллеля С, который в виде генотипа ТС (гетерозиготный) или СС (вариантный гомозиготный) и обуславливает нарушение экспрессии белка FOXP3, что отражается на количестве Т-регуляторных лимфоцитов - CD127⁺. Это необходимо для того, чтобы выявить наличие вариантного аллеля гена FOXP3, который характеризует замену (транзицию) одного пиримидинового основания в их цепочке на другое (С на Т), а значит потерю (модификацию) функции экспрессии самого FOXP3-рецептора CD127⁺. А выбор в качестве исследуемого гена FOXP3 обусловлен тем, что он кодирует экспрессию соответствующего белка и определяет уровень Т-рег клеток - CD127 и в случае полиморфизма гена (гетерозиготное или

вариантное гомозиготное его состояние) наблюдается снижение (замедление) физиологической супрессорной функции регуляторных Т-лимфоцитов. Причем, очень важно учитывать измененное состояние данного участка гена FOXP3 у матери ребенка, феномен которого даже при диком варианте генотипа у ребенка-сына, ассоциирован с его измененным (сниженным) уровнем фенотипа Т-рег.

Таким образом, при оценке детей в первом поколении по мужской линии влияния алюминия на нарушение физиологической иммуносупрессии в предлагаемом способе рекомендуется использовать три критерия: наличие патологического гомозиготного или гетерозиготного генотипов гена FOXP3 T(-3499)C (у ребенка и/или у матери), снижение в крови уровня лимфоцитов, содержащих на мембране рецептор CD127+, по отношению к нижней границе физиологической нормы, и превышение концентрации алюминия в крови по отношению к референтному уровню. Именно благодаря расширению информационных показателей, связанных с нарушением иммуносупрессии, и одновременно с количеством химического токсиканта - алюминия, в крови, и будет обеспечена необходимая точность и достоверность способа.

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 влияния комбината по производству алюминия (Красноярский край), характеризующейся высоким содержанием алюминия в атмосферном воздухе.

2. На указанной территории производят отбор группы детей - мальчиков, одной этнической популяции. Затем производят отбор пробы крови у обследуемого мальчика в специальные пробирки с антикоагулянтом ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) (0,05М раствор ЭДТА в соотношении 500 мкл крови на 50 мкл антикоагулянта) - для определения содержания алюминия, для выделения клеток крови.

При этом определение алюминия в крови проводят методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой в соответствии с требованиями Методики «Методы контроля. Химические факторы. Определение содержания химических элементов в диагностируемых биосубстратах, препаратах и биологически активных добавках методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной аргонной плазмой», изложенной в МУК 4.1.1483-03, с использованием масс-спектрометра с индуктивно связанной плазмой Agilent 7500сх с октопольной реакционной/столкновительной ячейкой (USA). Устанавливают, имеется ли место превышение концентрации этого загрязнителя в пробе крови над его референтным уровнем (в примере конкретного осуществления на территории Красноярского края референтным значением по алюминию был показатель, равный $0,006 \pm 0,004$ мг/дм³).

3. Также из указанной пробы крови производят выделение моноклеарных клеток. Для этого:

- производят забор у ребенка периферической венозной крови утром, натощак, в пробирку, содержащую этилендиаминтетраацетат (ЭДТА).

- кровь с ЭДТА разводят раствором хлорида натрия (9 г/л, рН=7,2) в два раза, наслаивают на 3 мл градиента плотности фиколла-урографина (концентрация фиколла составляла 9%, плотность градиента - 1,077 г/мл) и центрифугируют 30 мин при 1500 об/мин.

- образовавшееся в интерфазе «кольцо» моноклеарных клеток отбирают пипеткой, полученную клеточную взвесь дважды отмывают раствором хлорида натрия (9 г/л, рН 7,2).

- полученную взвесь моноклеаров ресуспендируют в рабочем растворе фосфатно-солевого буфера (PBS) до концентрации 1×10^6 клеток/мл. В состав фосфатно-солевого буфера PBS входит смесь солей: хлорида натрия, гидроортофосфата натрия, дигидроортофосфата натрия и азиды натрия, с рН=7,2.

- далее на полученных моноклеарных клетках определяют уровень Т-лимфоцитов, не содержащих рецептор CD127. Фенотипирование CD127⁺ лимфоцитов проводится методом проточной цитометрии на цитометре FACSCalibur фирмы «Becton Dickinson» («BD», USA) с использованием программы CellQuest-PrO («BD», USA). Т-лимфоциты CD127⁺ определяют с помощью меченых моноклональных антител (МКАТ), конъюгированных с FITC («eBioscience», США).

4. Также у указанного мальчика и его матери 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 (рН 7,5). Затем добавляют сорбент (каолин) и последовательными процедурами промывки отмывают фосфатно-солевым буфером (рН 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 (рН 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 праймера использовался участок ДНК гена FOXP3 T(-3499)C.

Проводят реакцию амплификации, это достигается тем, что для исследования аллельного состояния каждого гена у отдельного человека готовят свою реакционную смесь. В 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 выбранного гена FOXP3 (использован Набор реагентов для определения полиморфизма T(-3499)C гена FOXP3 ЗАО «Синтол», Россия). В эту же 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.

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 FOXP3 в исследуемом участке ДНК T(-3499)C (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 FOXP3.

5. И при одновременном выполнении следующих условий: наличие патологического (вариантного) гомозиготного или гетерозиготного генотипов гена FOXP3 у сына и/или у его матери, снижение в крови абсолютного и относительного уровня Т-лимфоцитов, не содержащих рецептор CD127 по отношению к нижней границе физиологической нормы CD127 у детей и при превышении концентрации алюминия в крови по отношению к референтному уровню, делают вывод о наличии нарушений физиологической иммуносупрессии у ребенка в первом поколении по мужской линии сотягощенной наследственностью в условиях избыточной экспозиции алюминием, а при отсутствии хотя бы одного из вышеуказанных условий делают вывод об отсутствии у мальчика нарушения физиологической иммуносупрессии под влиянием алюминия.

При проведении испытаний по реализации предлагаемого способа выполнено исследование детского населения (9 мальчиков и их матерей), проживающего в различных по содержанию алюминия в питьевой воде условиях среды обитания.

Кроме того, для подтверждения точности и достоверности оценки влияния экспозиции алюминия на возможность возникновения физиологической иммуносупрессии, у указанных детей был установлен уровень иммуноглобулина Е (IgE) - маркера уровня аллергизации, он будет тем выше, чем ниже контролирующей иммуносупрессию

клеточный фенотип CD127⁺. Этот маркер IgE позволяет достоверно установить степень сенсibilизации, характеризующих вариант проявлений агрессивности (активизации) иммунной системы.

Определение общего иммуноглобулина класса Е (IgE) основано на использовании «сэндвич» - варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к общему IgE человека. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, происходит связывание общего IgE, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата кроличьих поликлональных антител к IgE человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации общего IgE в исследуемом образце. Концентрацию общего IgE в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания общего IgE в калибровочных пробах. Полученные данные приведены в таблице 1.

Таблица 1

Пациент	Аллельное состояние гена FAS-14405C/T, определенного в пробе буккального эпителия		Уровень Т-лимфоцитов, содержащих на мембране рецептор CD127+, %		IgE общ, МЕ/мл	Содержание алюминия в крови, мг/дм ³
	Ген FOXP3 мать	Ген FOXP3 сын	CD127 ⁺ (абс), 10 ⁹ /л	CD127 ⁺ (отн), %		
1	T/C	C/C	0,011	0,49	716,8	0,06
2	T/T	T/T	0,047	1,64	25,6	0,01
3	T/T	T/T	0,051	1,67	15,3	0,01
4	T/C	C/C	0,038	0,95	80,7	0,04
5	T/C	T/T	0,022	1,14	643,9	0,04
6	T/T	T/T	0,059	1,80	10,0	0,01
7	T/T	T/T	0,04	1,20	50,0	0,01
8	T/C	T/T	0,01	0,37	760,9	0,05
9	T/T	T/T	0,044	1,38	24,2	0,01
норма	T/T	T/T	0,04-0,06 10 ⁹ /л	1,2-1,8 %	0-50 МЕ/мл	0,006±0,004 мг/дм ³

Данные, приведенные в таблице 1, показывают, что при сочетании вариантного (гетерозиготное CC или вариантное гомозиготное CT состояние аллеля) аллеля гена FOXP3 T(-3499)C у сына и/или у матери и концентрации виновного фактора (алюминия) выше референтной концентрации (норма 0,006±0,004 мг/дм³) наблюдается снижение концентрации Т-регуляторных лимфоцитов, не содержащих на мембране рецептор CD127, по отношению к значениям содержания лимфоцитов CD127⁺, соответствующим физиологической норме у детей (опыты 1, 4, 5, 8). И у этих мальчиков содержание в крови IgE общ. (маркер сенсibilизации как показатель нарушения иммуносупрессии) было выше физиологической нормы, что указывает на высокий уровень аллергизации, что в нашем случае служит подтверждением проявления агрессивности (активизации) иммунной системы, а значит нарушенного контроля этого процесса регуляторными

Т-лимфоцитами CD127⁺. И, таким образом, подтверждает точность и достоверность предлагаемого способа.

Тогда как при допустимом (на уровне референтной концентрации) содержании алюминия в крови у мальчиков отсутствуют проявления аллергизации в виде повышенного уровня общего IgE и наблюдается физиологический (в пределах значений нормы) уровень относительного и абсолютного содержания регуляторных Т-лимфоцитов CD127⁺.

Для иллюстрации реализации предлагаемого способа приведены два примера по конкретным мальчикам одного возраста и этнической принадлежности из группы обследованных пациентов.

Пример 1 (в таблице 1 пациент №1). Мальчик, 9 лет, русский. Мать - русская, 29 лет. Согласно предлагаемому способу, у мальчика выявлено нарушение физиологической иммуносупрессии. Установлен измененный (вариантный) аллель гена FOXP3 T(-3499)C у сына генотип CC (вариантная гомозигота) и у матери генотип CT (гетерозигота).

Концентрация Т-регуляторных лимфоцитов CD127⁺ ниже физиологической нормы: абс. CD127⁺ 0,011*10⁹/л (норма 0,04-0,06 10⁹/л), отн. CD127⁺ 0,49% (норма 1,2-1,8%). Повышен уровень сенсibilизации по критерию IgE общего (как фактора, отражающего нарушение иммуносупрессии) - 716,8 МЕ/мл (норма <50,0 МЕ/мл). Содержание алюминия в крови - 0,04 мг/дм³ (при норме не выше 0,01 мг/дм³). Косвенным доказательством этому служит следующее: в течении года у ребенка наблюдается затруднение носового дыхания (круглогодичный аллергический ринит), а также кожные высыпания (атопический дерматит).

Пример 2 (в таблице 1 пациент №2). Мальчик, 8 лет, русский. Мать - русская, 30 лет. Согласно предлагаемому способу, у мальчика не выявлено нарушений физиологической иммуносупрессии. Установлен нормальный (дикий) аллель гена FOXP3 T(-3499)C у сына генотип TT (нормальная гомозигота) и у матери генотип TT (нормальная гомозигота). Концентрация Т-регуляторных лимфоцитов CD127⁺ в пределах

физиологической нормы: абс. CD127⁺ 0,047*10⁹/л (норма 0,04-0,06 10⁹/л), отн. CD127⁺ 1,64% (норма 1,2-1,8%). Допустимый уровень сенсibilизации по критерию IgE общего (как фактора, отражающего нарушение иммуносупрессии) - 25,6 МЕ/мл (норма <50,0 МЕ/мл). Допустимое содержание алюминия в крови - 0,01 мг/дм³ (при норме не выше 0,01 мг/дм³). Отсутствие аллергических проявлений.

Таким образом, приведенные данные показывают, что при реализации предлагаемого способа с использованием предлагаемых критериев по содержанию алюминия в крови, абсолютному и относительному уровню Т-лимфоцитов CD127⁺ и варианта аллеля гена FOXP3 (участок гена T(-3499)C) обеспечивается его назначение.

(57) Формула изобретения

Способ выявления нарушений физиологической иммуносупрессии у детей в первом поколении по мужской линии с отягощенной наследственностью в условиях избыточной экспозиции алюминием, характеризующийся тем, что производят отбор пробы крови у ребенка-сына в первом поколении и определяют в пробе содержание алюминия, также из указанной пробы крови производят выделение моноклеарных клеток, далее на полученных моноклеарных клетках определяют уровень Т-регуляторных лимфоцитов, на мембране которых отсутствует рецептор CD127 (CD127⁻), затем у указанного ребенка,

а также у его матери, отбирают пробу буккального эпителия, осуществляют выделение из указанных проб дезоксирибонуклеиновой кислоты ДНК, на детектирующем амплификаторе с использованием полимеразной цепной реакции проводят генотипирование полиморфизма, используя в качестве праймера участок ДНК гена FOXp3 T(-3499)C, путем исследования его аллельного состояния, устанавливая при этом для гена FOXp3 T(-3499)C 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 FOXp3 T(-3499)C у сына и/или у матери, снижение в крови ребенка относительного и абсолютного уровня Т-регуляторных лимфоцитов, на мембране которых отсутствует рецептор CD127 (CD127⁻), по отношению к нижней границе физиологической нормы указанных Т-регуляторных лимфоцитов CD127⁻ для детей, и при превышении концентрации алюминия в крови ребенка выше референтного уровня, делают вывод о наличии нарушений физиологической иммуносупрессии у ребенка в первом поколении по мужской линии с отягощенной наследственностью в условиях избыточной экспозиции алюминием.