



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 33/00 (2006.01); G01N 33/49 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2017135742, 05.10.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
05.10.2017

Дата регистрации:
15.06.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 05.10.2017

(45) Опубликовано: 15.06.2018 Бюл. № 17

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),
Казакова Ольга Алексеевна (RU),
Дианова Дина Гумяровна (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: **Е.Н.БЕРЕЗИКОВА. КЛИНИКО-
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И
НЕЙРОГОРМОНАЛЬНЫЕ
МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ
ИШЕМИЧЕСКОГО
РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ, АПОПТОЗА
МИОКАРДА И СЕРДЕЧНОЙ
НЕДОСТАТОЧНОСТИ:
ИННОВАЦИОННАЯ СТРАТЕГИЯ
ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ
ДИАГНОСТИКИ, ПРОФИЛАКТИКИ И
ЛЕЧЕНИЯ / Автореферат дисс. на соис. уч.
степ. д.м.н., Томск, 2014. Т.И. Мещерякова
и др. Изучение влияния полиморфизма
(см. прод.)**

RU 2 657 821 C1

RU 2 657 821 C1

(54) Способ выявления у детей ранних нарушений физиологической функции сердца в условиях контаминации фенолом

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и биологии. Способ выявления у детей ранних нарушений физиологической функции сердца в условиях контаминации фенолом включает отбор пробы крови у ребенка и определение в пробе содержания фенола, отбор пробы буккального эпителия и осуществление выделения из указанной пробы дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), генотипирование полиморфизма генов MTHFR и SULT1A1, исследование генотипов гена MTHFR C677T (rs1801133) и гена SULT1A1 G2663A

(rs9282861), при одновременном выполнении следующих условий: наличие вариантного гомозиготного или гетерозиготного генотипов гена MTHFR C677T (rs1801133) и гена SULT1A1 G2663A (rs9282861), и при превышении концентрации фенола в крови выше фонового уровня более чем в 1,5 раза, диагностируют у ребенка наличие ранних нарушений физиологической функции сердца в виде функциональной кардиопатии, связанной с контаминацией фенолом. 1 табл.

(56) (продолжение):

C677T гена MTHFR на риск формирования несиндромальных орофациальных расщелин / РОССИЙСКИЙ ВЕСТНИК ПЕРИНАТОЛОГИИ И ПЕДИАТРИИ, 2013, 3, стр. 38-41. RU 2523418 C1, 20.07.2014.

R U 2 6 5 7 8 2 1 C 1

R U 2 6 5 7 8 2 1 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G01N 33/00 (2006.01); *G01N 33/49* (2006.01)(21)(22) Application: **2017135742, 05.10.2017**(24) Effective date for property rights:
05.10.2017Registration date:
15.06.2018

Priority:

(22) Date of filing: **05.10.2017**(45) Date of publication: **15.06.2018** Bull. № 17

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

**Dolgikh Oleg Vladimirovich (RU),
Zajtseva Nina Vladimirovna (RU),
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 byudzhethoe uchrezhdenie nauki
"Federalnyj nauchnyj tsentr
mediko-profilakticheskikh tekhnologij
upravleniya riskami zdorovyu naseleniya"
Federalnoj sluzhby po nadzoru v sfere zashchity
prav potrebitel'j i blagopoluchiya cheloveka
(FBUN "FNTS mediko-profilakticheskikh
tekhnologij upravleniya riskami zdorovyu
naseleniya") (RU)**(54) **METHOD FOR DETECTING EARLY PHYSIOLOGICAL CARDIAC MALFUNCTION IN CHILDREN IN CONDITIONS OF CONTAMINATION WITH PHENOL**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to the field of medicine and biology. Method for detecting early physiological cardiac malfunction in children with phenol contamination includes the taking blood samples from the child and the determination of the phenol content in the sample, taking a sample of the buccal epithelium and isolation from this sample of deoxyribonucleic acid (DNA), genotyping of polymorphism of MTHFR and SULTIAI genes, studying of genotypes of the gene MTHFR C677T (rs1801133) and gene SULTIAI G2663A (rs9282861),

while simultaneously meeting the following conditions: presence of variant homozygous or heterozygous genotypes of the gene MTHFR C677T (rs1801133) and gene SULTIAI G2663A (rs9282861), and if the concentration of phenol in the blood exceeds the background level by more than 1.5 times, the child is diagnosed with early physiological cardiac malfunction in the form of functional cardiopathy associated with contamination with phenol.

EFFECT: method is proposed for detecting early physiological cardiac malfunction in children.

1 cl, 1 tbl

Изобретение относится к области медицины и биологии, в частности, к исследованиям ксенобиотиков, а именно, фенола, вызывающего нарушение состояния сердечно-сосудистой системы у детей, проживающих в районах экологического неблагополучия, и может быть использовано для ранней диагностики и прогнозирования токсического действия фенола на нарушение физиологической функции сердца у 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 нарушения физиологической функции сердца ребенка, а, кроме того, могут быть использованы при формировании санитарно-гигиенических мероприятий по предупреждению и устранению воздействия вредных химических веществ, обуславливающих формирование функциональной кардиопатии у детей.

В настоящее время в атмосферном воздухе промышленных центров присутствует смесь химических загрязнителей от предприятий и автотранспорта, включающая взвешенные вещества, оксид углерода, диоксид азота, бензол, фенол, формальдегид и другие. Несмотря на то, что в последние годы в Пермском крае отмечается снижение уровня загрязнения атмосферного воздуха, в 2014-2015 году регистрировался повышенный уровень взвешенных частиц 1,2-2,8 ПДКм.р., фенола 1,4-2,5 ПДКм.р., формальдегида 1,5-2,5 ПДКм.р. в атмосферном воздухе. Выявлено, что повышенная концентрация в среде обитания техногенных химических факторов, тройных к сердечно-сосудистой системе, создает риск развития функциональных нарушений в сосудах и сердце у детей.

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

Под физиологической функцией сердца понимается нагнетание крови из вены в артерию в ритмичном темпе, при котором создается градиент давления, что влечет за собой ее бесперебойное движение. Поэтому гемодинамическую функцию сердца можно отнести к одной из его главных физиологических функций. К другим функциям сердца можно отнести возбудимость, способность проводить возбуждение, сократимость, автоматизм и др.

Наблюдаемые у ребенка отклонения в функционировании сердца характеризуются рядом клинических состояний, к которым относятся малые аномалии развития сердца (МАРС), под которым понимают анатомическое изменение сердца и магистральных сосудов, не приводящие к грубым нарушениям функций сердечно-сосудистой системы. МАРС - многочисленная группа заболеваний сердца, возникающих в результате неправильного развития соединительной ткани. Так причиной дополнительной хорды в сердечном желудочке является генетическая предрасположенность.

При этом экотоксиканты, в частности, фенол, способны вызывать изменения со стороны центральной нервной системы, почек, печени, органов дыхания и сердечно-сосудистой системы, что может способствовать нарушению не только адаптационных возможностей организма, но и возникновению отклонений со стороны основных функций сердца - нарушение автоматизма, возбудимости и проводимости, диффузные поражения миокарда (Вредные химические вещества. Галоген- и кислородсодержащие

органические соединения. В.А. Филов и др. СПб - Химия 1994 г.). Этим и обусловлена потребность в установлении нарушения физиологической функции сердца, модифицированной фенолом.

5 В настоящее время хорошо изучены факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний, к которым относятся высокий уровень артериального давления крови, избыток массы тела, сахарный диабет и др. Разработаны клинические и биохимические маркеры повышенного риска сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ): высокий уровень общего холестерина и холестерина липопротеидов низкой плотности, низкий уровень холестерина липопротеидов высокой плотности, высокий уровень глюкозы сыворотки
10 крови и др.

В настоящее время риск ССЗ оценивается по данным клинико-инструментальных методов (измерение уровня артериального давления крови, эхо- и электрокардиография, ангиография и т.д.), биохимических показателей (липидный спектр крови, уровень глюкозы крови), с учетом воздействия вредных внешне-средовых факторов.

15 Из уровня техники известно, что в настоящее время большинство способов диагностики нарушений сосудисто-сердечной системы основано на использовании в качестве маркеров показателей крови и генетические критерии. Причем известно, что при этом в качестве маркерного показателя используют ген MTHFR C677T.

Из уровня техники (Патент РФ №2376372) известен способ генетической диагностики
20 подверженности к сердечно-сосудистым заболеваниям. Способ может быть использовано для диагностики наследственной предрасположенности к сердечно-сосудистым заболеваниям у человека и основан на определении генотипов по полиморфным вариантам A1166C гена AGTR1, A-240T и A2350G гена ACE, C677T гена MTHFR, T174M гена AGT, C825T гена GNB3, VNTR4a/b и G894T гена NOS3, G1691A
25 гена F5, PLA1/A2 гена ITGB3, G20210A гена F2 и оценке риска путем суммирования количества баллов, присвоенных каждому генотипу. При этом генотипам «низкого» риска сердечно-сосудистой патологии присваивается 0 баллов, к ним относятся генотипы 1166AA гена AGTR1, -240AA, 2350AA гена ACE, 677CC гена MTHFR, 174TT гена AGT, 825CC гена GNB3, VNTR4bb и 894GG гена NOS3, 1691GG гена F5, PLA1/A1 гена ITGB3,
30 20210GG гена F2. Генотипам «среднего» риска присваивается 0,5 баллов, к ним относятся генотипы 1166AC гена AGTR1, -240AT и 2350AG гена ACE, 677CT гена MTHFR, 174TM гена AGT, 825CT гена GNB3, VNTR4ab и 894GT гена NOS3. Генотипам «высокого» риска присваивается 1 балл, к ним относятся генотипы 1166CC гена AGTR1, -240TT и 2350GG гена ACE, 677TT гена MTHFR, 174MM гена AGT, 825TT гена GNB3, VNTR4aa
35 и 894GT гена NOS3, 1691GA и 1691AA гена F5, PLA1/A2 и PLA2/A2 гена ITGB3, 20210GA и 20210AA гена F2. Риск сердечно-сосудистых болезней считается «низким» при сумме баллов от 0 до 3, средним - от 3,5 до 6, высоким - от 6,5 до 11 баллов.

Недостатком указанного способа является то, что он не позволяет ответить на вопрос о реализации заявленного риска (уровне экспрессируемых геном белков,
40 например, гомоцистеина) и не отвечает на вопрос о факторе, который мог бы вызвать сердечно-сосудистую патологию (инфекционный, химический агент).

Известен способ расширенного скрининга предрасположенности к сердечно-сосудистым заболеваниям и биочип для осуществления этого способа (Патент РФ №2453606). Способ включает стадию выделения геномной ДНК из клинического
45 образца, амплификацию участков генов ACE, APOA4, APOA5, APOB, EDN1, MEF2A, FGA, ADRB1, TNBS4, APOE, FBN1, AGXT, MTHFR, CCR2, F5, F2, F7, ABCA1, ITGB3, AGTR2, B2R, DES, TLR4, NOS3, KDR, MMP9, TNBS2, LPL, MPO, содержащих последовательности полиморфных локусов, перечисленные в SEQ ID 1-672 и получение

одноцепочечного флюоресцентно меченого продукта методом ник-трансляции и рестрикции. Приготавливают биочип для скрининга предрасположенности к заболеваниям сердечно-сосудистой системы, содержащий набор иммобилизованных олигонуклеотидов SEQ ID 1-672. Осуществляют гибридизацию меченого амплифицированного продукта на указанном биочипе. Регистрируют результаты при длине волны 635 нм и 532 нм для красителей Cy5 и Cy3 соответственно. Интерпретируют результаты гибридизации путем сравнения интенсивности флюоресцентных сигналов, полученных при совершенной и несовершенной гибридизации. Известное изобретение позволяет получить комплексную оценку генетических предрасположенностей пациента к сердечно-сосудистым заболеваниям и оценить риски развития сердечно-сосудистых заболеваний.

Однако его недостатком является то, что в биочип не включен участок гена SULT1A1, а значит не оценивался риск токсического воздействия на сердечно-сосудистую систему фенолсодержащих соединений, в метаболизме которых принимает участие сульфотрансфераза.

Также известно использование в способах диагностики заболеваний в качестве критерия гена SULT1A1 Arg213His. В патенте РФ №2607031 описан способ выявления кандидатных генов для проведения популяционных исследований генетического полиморфизма у детей, проживающих в условиях стронциевой геохимической провинции. При осуществлении указанного способа производят отбор пробы крови у детей, проживающих в стронциевой геохимической провинции. Из этой пробы выделяют ДНК и создают библиотеку коротких отрезков ДНК. Проводят их гибридизацию с набором заданных праймеров, представляющих в совокупности жидкий ДНК-биочип. Затем гибридизованные участки подвергают секвенированию, устанавливая фактическую последовательность нуклеотидов, составляющих гены, и сравнивают эту последовательность с референтной последовательностью нуклеотидов в генах. Устанавливают отклонения в последовательности, принимая такие отклонения, как ассоциированные с возможными нарушениями здоровья ребенка под действием стронция. В качестве указанных генов используют: CYP1A2, TLR4, TERT, FAS, FOXP3, TP53, MTHFR, SULT1A1, VEGF, ZMPSTE, SOD, SIRT3, NOS3, PPARG и CPOX. В последовательности нуклеотидов каждого из указанных генов идентифицируют количество однонуклеотидных полиморфизмов, и в случае наличия таких полиморфизмов в гене в количестве 6 и более прогнозируют связь такого измененного гена с воздействующей на ребенка стронциевой экспозицией в условиях стронциевой геохимической провинции. Этот ген принимают в качестве кандидатного гена для проведения последующих популяционных исследований генетического полиморфизма у детей, проживающих в условиях стронциевой геохимической провинции. Настоящее изобретение позволяет обеспечить возможность выявления через генетический полиморфизм кандидатных генов у детей, ассоциированных с воздействием стронция, и использования в дальнейшем полученной информации для популяционных исследований с целью установления на ранней стадии определенных заболеваний, обусловленных нарушенным геном.

Однако этот известный способ не предназначен для диагностики ранних нарушений в сердечно-сосудистой системе ассоциированных с фенолом.

При этом из уровня техники не были выявлены известные способы диагностики ранних нарушений физиологической функции сердца в условиях контаминации фенолом, поэтому сделать выбор ближайшего аналога к заявляемому объекту не представляется возможным.

Технический результат, достигаемый предлагаемым изобретением, заключается в обеспечении точности оценки влияния фенола на наличие нарушения физиологической функции сердца в виде функциональной кардиопатии, с обеспечением возможности в последующем судить о развитии таких состояний у детей уже на ранних стадиях их формирования.

Указанный технический результат достигается предлагаемым Способом выявления у детей ранних нарушений физиологической функции сердца в условиях контаминации фенолом, характеризующимся тем, что производят отбор пробы крови у ребенка, и определяют в пробе содержание фенола, 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 MTHFR и SULT1A1, используя в качестве праймера участок ДНК путем исследования генотипов гена MTHFR C677T (rs1801133) и гена SULT1A1 G2663A (rs9282861), 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 вариантное гомозиготное или гетерозиготное генотипов гена MTHFR C677T (rs1801133) и гена SULT1A1 G2663A (rs9282861), и при превышении концентрации фенола в крови выше фонового уровня более чем в 1,5 раза, диагностируют у ребенка наличие ранних нарушений физиологической функции сердца в виде функциональной кардиопатии, связанной с контаминацией фенолом.

Поставленный технический результат достигается за счет следующего.

В качестве критерия нарушений физиологической функции сердца в условиях контаминации фенолом рекомендуется использовать гетерозиготные или вариантные (патологические) гомозиготные генотипы гена MTHFR C677T (rs1801133), фенотипирующего гомоцистеин, вызывающего повреждение эндотелиальной ткани и нарушения развития соединительной ткани, и гетерозиготные или вариантные гомозиготные генотипы гена SULT1A1 G2663A (rs9282861), ответственного за экспрессию сульфотрансферазы, метаболизирующей (инактивирующей) фенолы.

Согласно данным ряда исследований функциональное состояние сердечно-сосудистой системы объективно отражает уровень адаптированности организма к факторам среды обитания. Присутствие техногенных химических веществ в организме приводит к развитию нарушений в сосудах и сердце, которые обуславливают развитие преморбидных состояний и способствуют прогрессированию хронических заболеваний.

Наряду с дыхательной системой в патологический процесс нередко вовлекается и сердечно-сосудистая система, что связано как с прямым кардиотоксичным действием ароматических и кислородсодержащих углеводородов, так и с опосредованным, обусловленным нарушением функции внешнего дыхания и изменением функционирования вегетативной нервной системы под действием техногенных химических факторов. Показано, что длительное воздействие фенола и формальдегида нарушают процессы тканевого метаболизма, что в дальнейшем приводит к дистрофическим изменениям тканей и органов-мишеней (Сенаторова А.С., Логвинова О.Л., Бойченко А.Д., Галдина И.М. Состояние диастолической функции левого желудочка у детей с бронхолегочной дисплазией // Международный журнал педиатрии, акушерства и гинекологии. - 2013. - Том 4. - №2. - С. 28-33).

Установлено, что хроническое ингаляционное воздействие формальдегида и фенола формирует опасность развития нарушений со стороны органов дыхания (индекс

опасности НИ - до 3,73), центральной нервной системы (НИ - до 2,33) и сердечно-сосудистой системы (ССС) (НИ - до 2,31).

Одной из причин формирования у ребенка патологии ССС, в т.ч. функциональных кардиопатий, являются замены в гене метилентетрагидрофолатредуктазы - МТНFR, как в промоторной, так и в экзонных областях гена. Функция белкового продукта гена метилентетрагидрофолатредуктаза (МТНFR С677Т) является основным ферментом метаболизма гомоцистеина.

Гомоцистеин - продукт метаболизма метионина - одной из 8 незаменимых аминокислот организма. В норме он не накапливается. Обладает выраженным токсическим действием на клетку. Циркулируя в крови, повышенный гомоцистеин повреждает сосуды, тем самым повышая свертываемость крови и образование микротромбов в сосудах.

Снижение активности метилентетрагидрофолатредуктазы - одна из важных причин накопления гомоцистеина в крови.

Интерпретация аллелей и генотипов, гомозиготных по данной мутации (генотип ТТ), отмечает термолабильность МТНFR и снижение активности фермента примерно до 35% от среднего значения. Наличие этой мутации сопровождается повышением уровня гомоцистеина в крови. Генотип СС является нормой.

Ген метилентетрагидрофолатредуктазы МТНFR С677Т: Фермент является ключевым звеном фолатного цикла и катализирует реакцию превращения гомоцистеина в метионин. Гомоцистеин - серосодержащая аминокислота, являющаяся продуктом переработки в организме так называемой незаменимой аминокислоты метионина. Гомоцистеин под воздействием фолиевой кислоты и витамина В-12 возвращается обратно в метионин, или под влиянием витамина В-6 превращается в следующий продукт обмена - цистотионин.

Повышение уровня гомоцистеина крови на 5 мкмоль/л приводит к увеличению риска атеросклеротического поражения сосудов на 80% у женщин и на 60% у мужчин. У людей с повышенным уровнем гомоцистеина повышается риск возникновения болезни Альцгеймера и старческого слабоумия.

При сочетании повышения гомоцистеина крови и сахарного диабета чаще возникают сосудистые осложнения - заболевания периферических сосудов, нефропатия, ретинопатия и другие.

Причиной повышенного уровня гомоцистеина крови является следующее. Вариант С/Т в гене МТНFR является мутацией. Замена цитозина на тимин в 677 положении указанного гена приводит к снижению функциональной активности фермента до 35% от среднего значения. Полиморфизм 677С>Т широко распространен в различных популяциях и связан по крайней мере с двумя группами многофакторных заболеваний: васкулярными заболеваниями и дефектами развития нервной трубки у плода.

Дефекты в данном гене часто приводят к совершенно различным заболеваниям с широким спектром клинических симптомов: умственное и физическое отставание в развитии, перинатальная смерть, васкулярные и нейродегенеративные заболевания, диабет, рак и другие.

Назначение фолиевой кислоты может значительно снизить риск последствий данного варианта полиморфизма. Данные о полиморфизме: частота встречаемости гомозиготы в популяции - 10-12%; частота встречаемости гетерозиготы в популяции - 40%.

Функция гена сульфотрансферазы SULT1A1:

Деградация фенолов происходит при участии фермента цитозоля - сульфотрансферазы. Реакция сульфатной конъюгации происходит с участием

специального фермента сульфотрансферазы, γ -аминомасляная кислота (ГАМК) образуется из глутамата. Сульфогруппы вводятся в молекулы протеогликанов сульфотрансферазами. Сульфотрансферазой осуществляется сульфирование андрогенов, стероидов де ново- агонистов и антагонистов ГАМК, одновременно они участвуют в модуляции нейроэндокринной регуляции, гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) используется для лечения сосудистых заболеваний головного мозга.

В качестве критерия ранних нарушений ССС в условиях контаминации фенолом рекомендуется использовать измененный генотип гена фермента метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFR C677T (rs1801133), отвечающего за экспрессию гомоцистеина и состояние сосудистого эндотелия; измененный генотип гена сульфотрансферазы SULT1A1 G2663A (rs9282861), отвечающего за метаболизм и конъюгацию фенолов, и уровень фенола в крови. Реализующим процесс сосудистых нарушений и функциональной кардиопатии (малых аномалий развития сердца) служит экспозиция фенола, превышающая фоновую концентрацию (фоновый уровень фенола в крови $0,01 \pm 0,01$ мг/л). Подтверждающим фактором эндотелиальных нарушений служит нарастание сосудистых изменений по критерию содержания гомоцистеина (повышение), что характеризует вероятность возникновения функциональной кардиопатии.

Благодаря тому, что в заявляемом способе в качестве диагностических критериев предлагается использовать именно полиморфизм гена MTHFR C677T (rs1801133) и гена SULT1A1 G2663A (rs9282861), обеспечивается точность исследования, т.к. у ребенка учитывается детерминация вероятных нарушений функции сердечно-сосудистой системы (экспрессия гомоцистеина), а также предрасположенность к нарушению функции детоксикации кардитропного токсиканта фенола, способного реализовать (инициировать) или усугубить имеющийся дефект (полиморфизм) гена метилентетрагидрофолатредуктазы. Поэтому по этим показателям можно судить о генетически детерминированном характере функциональных нарушений сердечно-сосудистой системы 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 - фенола, именно в крови обусловлено тем, что кровь является самой гомеостатичной средой (управляемость и регулируемость концентраций составляющих ее компонентов), имеющей реферируемые (фоновые) уровни в отношении техногенных химических веществ.

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 (ПЦР) проведения генотипирования полиморфизма указанных генов MTHFR и SULT1A1. При этом предлагается использовать в качестве праймера участок ДНК гена MTHFR C677T (rs1801133) и гена SULT1A1 G2663A (rs9282861), устанавливая при этом для каждого гена одно из следующих его состояний: гетерозиготное, или нормальное гомозиготное, или вариантное гомозиготное.

У гена MTHFR C677T 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). У гена SULT1A1 G2663A 2 аллеля (1 пара аллелей) G и A (G - дикий или нормальный, A - мутантный или вариантный), причем полиморфные генотипы - GA (гетерозиготный) или AA (вариантный гомозиготный).

5 Таким образом, при оценке влияния фенола на нарушение ССС в предлагаемом способе рекомендуется использовать следующие критерии: наличие вариантного гомозиготного или гетерозиготного генотипов гена MTHFR C677T (rs1801133) и наличие вариантного гомозиготного или гетерозиготного генотипов гена SULT1A1 G2663A (rs9282861), и превышение концентрации фенола в крови по отношению к фоновому уровню более чем в 1,5 раза.

10 Именно благодаря расширению информационных показателей, связанных с полиморфными вариантами генов, ассоциированных с тропной к ССС аминокислотой гомоцистеином и метаболизирующим фенол ферментом сульфотрансферазой и одновременно с количеством химического токсиканта - фенола, в крови, и будет обеспечена точность оценки модифицирующего влияния фенола на нарушение физиологической функции сердца.

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.

20 1. Выбирают территорию экологического риска, характеризующуюся наличием химических токсикантов, обусловленных экологической средой обитания. Исследования были проведены на территории одного из городов Пермского края, характеризующейся наличием в атмосферном воздухе повышенных концентраций фенола (2,2 ПДКм.р.)

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 фенола. При этом определение фенола в крови проводят методом газовой хроматографии на приборе Кристалл-5000 в соответствии с требованиями СТО, М. 12-2013 и устанавливают, имеется ли превышение концентрации этого контаминанта в пробе крови над его фоновым уровнем (в примере конкретного осуществления на территории Пермского края фоновым значением по фенолу был показатель равный $0,01 \pm 0,01$ мг/л).

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).

40 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 (рН 8,0). Экстракт подвергают центрифугированию. После центрифугирования пробирки надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК.

Полученный материал готов к постановке полимеразной цепной реакции (ПЦР).

5 Полимеразную цепную реакцию проводят на детектирующем амплификаторе с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» с использованием готовых наборов праймеров и зондов производства ЗАО «Синтол», Россия, в котором в качестве праймеров использовались участки ДНК генов МТНFR С677Т (rs1801133) и SULT1A1 G2663А (rs9282861).

10 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 МТНFR 15 С677Т (rs1801133) и гена SULT1A1 G2663А (rs9282861) (использованы Наборы реагентов для определения полиморфизма МТНFR С677Т (rs1801133) и полиморфизма гена SULT1A1 G2663А (rs9282861) ЗАО «Синтол», Россия). В каждую пробирку добавляют остальные компоненты необходимые для осуществления ПЦР: нуклеотиды (дезоксинуклеозидтрифосфаты: по 10 мМ дАТФ, дТТФ, дГТФ, дЦТФ), буфера (100 20 мМ трис-НСl-буфера, 500 мМ КСl, 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.

25 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).

30 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 35 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 40 соответствующей графе в таблице результатов, отображаемой в программном обеспечении для амплификатора CFX96.

По соотношению пороговых циклов, полученных по двум каналам детекции, определяют состояние гена МТНFR в исследуемом участке ДНК С677Т (rs1801133), а также гена SULT1A1 в исследуемом участке ДНК G2663А (rs9282861) (метод аллельной дискриминации). Возможных вариантов состояния гена было два: гомозиготное - в 45 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 MTHFR C677T (rs1801133) и SULT1A1 G2663A (rs9282861).

4. И при выполнении следующих условий: наличие вариантного гомозиготного или гетерозиготного генотипов генов MTHFR C677T (rs1801133) и SULT1A1 G2663A (rs9282861) и при превышении концентрации фенола в крови не менее, чем в 1,5 раза выше фонового уровня, диагностируют наличие у ребенка нарушения физиологической функции сердца в виде функциональной кардиопатии, под воздействием фенола.

При проведении испытаний по реализации предлагаемого способа выполнено исследование детского населения, проживающего в различных по содержанию фенола условиях среды обитания.

Были сформированы две группы: группа наблюдения, дети которой проживали на неблагополучной в отношении фенола территории, и группа сравнения, проживающая в условиях санитарно-гигиенического благополучия. В группу наблюдения вошли 112 детей (средний возраст $6,05 \pm 0,41$ года; 49,1% мальчиков и 50,9% девочек). В группу сравнения вошли 88 детей (средний возраст $6,22 \pm 0,21$ года; 45,5% мальчиков и 54,5% девочек). Группы были сопоставимы по тендерному, возрастному и социальным критериям.

На территориях проживания детей группы наблюдения отмечено превышение содержания фенола до 2,2 ПДК м.р.

Оценка риска здоровью детей показала, что при хронической экспозиции контаминантов коэффициенты опасности для фенола составили - до 1,12. Установлено, что хроническое ингаляционное воздействие фенола формирует опасность развития нарушений со стороны органов дыхания (индекс опасности НИ - до 3,73), центральной нервной системы (НИ - до 2,33) и сердечно-сосудистой системы (НИ - до 2,31).

Оценка риска развития заболеваний осуществляется по стандартизованной методике в соответствии с «Руководством по оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду» (Р 2.1.10.1920-04);

Исследование содержания в крови детей химических веществ техногенного происхождения показало, что концентрация фенола в крови детей группы наблюдения была достоверно более чем в 1,5 раза выше фоновых значений и в 1,8 раза выше этого показателя группы сравнения ($0,031 \pm 0,002$ мг/дм³ и $0,017 \pm 0,012$ мг/дм³ соответственно, $p=0,001$).

Функциональное исследование состояния сердечно-сосудистой системы показало, что среднегрупповое значение систолического и диастолического артериального давления у обследованных детей не имело достоверных различий ($p=0,38-0,74$) и соответствовало физиологической возрастной норме ($p=0,42-0,87$).

В тоже время, у 7,5% у детей, проживающих на территориях с неудовлетворительным качеством атмосферного воздуха по санитарно-химическим показателям, выявлено повышенное артериальное давление, отсутствующее в группе сравнения ($p=0,039$).

Относительный риск нарушений функциональных возможностей сердечно-сосудистой системы (адаптационного резерва) у детей группы наблюдения был в 4,7 раза выше (отношение шансов OR=4,68; доверительный интервал DI=0,94-23,22; вероятность $p=0,08$).

Сравнительный анализ среднегрупповых показателей электрокардиограммы у обследованных детей показал, что все параметры временных критериев зубца P, сегмента QRS, интервалов (PQ и QT) и положения электрической оси сердца находились в пределах нормальных физиологических значений. Однако, у детей группы наблюдения частота сердечных сокращений была достоверно ниже группы сравнения аналогичной

возрастной категории ($80,3 \pm 5,3$ уд. в мин и $88,5 \pm 3,1$ уд. в мин соответственно, $p=0,009$).

Установлена обратная корреляционная зависимость между частотой сердечных сокращений и уровнем фенола в крови ($r=-0,322$, $p=0,001$), то есть при повышении концентрации фенола отмечается брадикардия (урежение частоты сердечных сокращений).

Исследования состояния процессов возбудимости, проводимости и автоматизма миокарда показали, что отклонения показателей от физиологической нормы зафиксированы у 73,5% детей группы наблюдения, в то время как в группе сравнения у 52,2% ($p=0,005$).

Наиболее частым видом патологии у детей группы наблюдения являлись нарушения процессов возбудимости в виде синусовой брадиаритмии (32,3%), которая встречалась достоверно чаще в 2,2 раза, чем в группе сравнения (14,4%, $p=0,004$). Синусовая брадикардия также преобладала в группе наблюдения, однако достоверных различий по частоте встречаемости со сравниваемой группой не отмечено (26,5% против 19,8% соответственно, $p=0,29$). В то же время, синусовая аритмия регистрировалась в 6,6 раза чаще у детей группы наблюдения по сравнению с группой сравнения (9,9% против 1,5% соответственно, $p=0,029$).

Относительный риск возникновения нарушений процессов возбудимости миокарда у детей группы наблюдения был в 2,5 раза выше, чем у детей, проживающих на территории санитарно-гигиенического благополучия ($OR=2,54$; $DI=1,32-4,891$; $p=0,008$).

Таким образом было доказано влияние фенола на возникновение нарушений у детей со стороны ССС.

Для доказательства возможности реализации предлагаемого способа и достоверности получаемых результатов, ниже приведена таблица 1, в которой представлены результаты генетических исследований детей и подтверждающий показатель - уровень гомоцистеина, вызывающего повреждение эндотелиальной ткани и нарушение развития соединительной ткани, процессов определяющих развитие функциональных нарушений сердца.

Для доказательства достоверности и точности предлагаемого способа, всем детям проведены ультразвуковые исследования сердца. Наличие МАРС (дополнительной хорды левого желудочка), служило подтверждением функциональных нарушений сердца (функциональной кардиопатии). Наличие нарушений физиологической функции сердца (наличие функциональной кардиопатии) в условиях контаминации фенолом у всех детей с данной патологией сопровождается одновременной идентификацией вариантного гомозиготного или гетерозиготного генотипов гена *MTHFR C677T* (*rs1801133*) и гена *SULT1A1 G2663A* (*rs9282861*), а также превышением концентрации фенола в крови выше фонового уровня более чем в 1,5 раза.

При этом подтверждающий наличие изменений в функционировании эндотелиальной и соединительной ткани ССС уровень гомоцистеина в крови не всегда характеризовался его повышением в случае УЗИ-идентифицированной кардиопатологии (опыт 7 таблица 1), что указывает на низкую чувствительность данного теста (по гомоцистеину), не позволяющего отнести его к маркерам ранних нарушений физиологической функции сердца.

Полиморфизм гена *MTHFR C677T* реализуется развитием функциональных нарушений сердца (функциональной кардиопатии) даже без фенотипически повышенного уровня гомоцистеина (опыт 10 таблица 1) при наличии дополнительно полиморфно измененного гена *SULT1A1 G2663A*, который перестает контролировать действие внешнесредового стресс-фактора, в качестве которого выступает фенол.

Таким образом, предлагаемый способ позволяет с достаточной достоверностью

установить ранние нарушения физиологической функции сердца, ассоциированные с влиянием фенола, по заявляемым генетическим критериям и содержанию фенола в крови.

Таблица 1

| Пациент № пп | Возраст (лет) | Содержание фенола в крови, мг/л (фоновый уровень 0,01±0,01 мг/л) | Генотип гена <i>MTHFR</i> C677T (rs1801133), определенного в пробе буккального эпителия | Генотип гена <i>SULT1A1</i> G2663A (rs9282861), определенного в пробе буккального эпителия | Уровень гомоцистемна, мкмоль/дм ³ |
|---------------------------------|------------------|--|--|---|--|
| Пациенты с кардиопатией | | | | | |
| 1 | 7 | 0,031 | T/T | A/A | 15 |
| 2 | 5 | 0,038 | T/T | A/A | 14,5 |
| 3 | 5 | 0,039 | C/T | A/A | 16,3 |
| 4 | 7 | 0,048 | T/T | A/A | 19,2 |
| 5 | 6 | 0,049 | C/T | G/A | 20,6 |
| 6 | 6 | 0,036 | C/T | G/A | 13,3 |
| 7 | 5 | 0,030 | C/T | G/A | 11,0 |
| Пациенты без кардиопатии | | | | | |
| 8 | 5 | 0,01 | C/T | G/A | 6,4 |
| 9 | 5 | 0,012 | C/T | A/A | 7,4 |
| 10 | 5 | 0,025 | C/T | G/A | 12,9 |
| 11 | 7 | 0,028 | C/C | G/G | 10,9 |
| 12 | 6 | 0,029 | T/T | A/A | 9,4 |
| 13 | 7 | 0,024 | C/C | G/G | 9,9 |
| НОРМА | | 0,01±0,01 | C/C | G/G | 4,6-12,44 |

(57) Формула изобретения

Способ выявления у детей ранних нарушений физиологической функции сердца в условиях контаминации фенолом, характеризующийся тем, что производят отбор пробы крови у ребенка и определяют в пробе содержание фенола, 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 *MTHFR* и *SULT1A1*, используя в качестве праймера участки ДНК путем исследования генотипов гена *MTHFR* C677T (rs1801133) и гена *SULT1A1* G2663A (rs9282861), 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 вариантное гомозиготное или гетерозиготное генотипов гена *MTHFR* C677T (rs1801133) и гена *SULT1A1* G2663A (rs9282861), и при превышении концентрации фенола в крови выше фонового уровня более чем в 1,5 раза, диагностируют у ребенка наличие ранних нарушений физиологической функции сердца в виде функциональной кардиопатии, связанной с контаминацией фенолом.