

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2561599

СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ИММУННЫХ НАРУШЕНИЙ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ СТРОНЦИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИХ КРИТЕРИЕВ

Патентообладатель(ли): *Федеральное бюджетное учреждение науки
"Федеральный научный центр медико-профилактических технологий
управления рисками здоровью населения" (ФБУН "ФНЦ медико-
профилактических технологий управления рисками здоровью населения") (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2014135360

Приоритет изобретения **29 августа 2014 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре
изобретений Российской Федерации **03 августа 2015 г.**

Срок действия патента истекает **29 августа 2034 г.**

*Заместитель руководителя Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Л.Л. Кирий



Автор(ы): **ДОЛГИХ Олег Владимирович (RU), ЗАЙЦЕВА Нина Владимировна (RU), КРИВЦОВ Александр Владимирович (RU), БУБНОВА Ольга Алексеевна (RU), ПРЕДЕЙНА Регина Атласовна (RU), ВДОВИНА Надежда Алексеевна (RU), ЛЫХИНА Татьяна Станиславовна (RU), ГОРШКОВА Ксения Геннадьевна (RU), ПИРОГОВА Елена Алексеевна (RU)**



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21)(22) Заявка: 2014135360/15, 29.08.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.08.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 29.08.2014

(45) Опубликовано: 27.08.2015 Бюл. № 24

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2180116 C1, 27.02.2002. RU 2092851
C1, 10.10.1997. WO 2011075773 A1, 30.06.2011.
ЗАБРОДСКИЙ П.Ф. и др. Нарушение
функции субпопуляций Т-лимфоцитов при
подостром отравлении токсичными
химикатами // Российский химический
журнал, 2007, N2, стр.98-100

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),
БУБНОВА Ольга Алексеевна (RU),
ПРЕДЕИНА Регина Атласовна (RU),
ВДОВИНА Надежда Алексеевна (RU),
ЛЫХИНА Татьяна Станиславовна (RU),
ГОРШКОВА Ксения Геннадьевна (RU),
ПИРОГОВА Елена Алексеевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное бюджетное учреждение науки
"Федеральный научный центр медико-
профилактических технологий управления
рисками здоровью населения" (ФБУН "ФНЦ
медико-профилактических технологий
управления рисками здоровью населения")
(RU)

(54) СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ИММУННЫХ НАРУШЕНИЙ ПОД
ВОЗДЕЙСТВИЕМ СТРОНЦИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИХ КРИТЕРИЕВ

(57) Формула изобретения

Способ прогнозирования возникновения иммунных нарушений под воздействием стронция с использованием иммуногенетических критериев, характеризующийся тем, что производят отбор пробы крови у пациентов с территории с повышенным содержанием стронция в объектах окружающей среды; в указанной пробе определяют содержание стронция, в пробе крови пациентов, с содержанием стронция выше фонового значения, определяют содержание лимфоцитов CD8⁺ путем сепарации их из клеток крови, далее выделенную фракцию лимфоцитов CD8⁺ делят на две части, одну из которых подвергают инкубации со стронцием, а вторую оставляют в качестве контрольной, причем инкубацию осуществляют путем введения в пробу CD8⁺ 10 мг/л стронция, затем определяют в обеих пробах лимфоцитов CD8⁺ количество рибонуклеиновой кислоты РНК путем выделения ее из сепарированных клеток CD8⁺, проводят реакцию обратной транскрипции РНК в дезоксирибонуклеиновую кислоту ДНК, в которой определяют количество гена дефензина альфа, причем при этом

определении в качестве внутреннего контроля используют ген домашнего хозяйства GAPDH, далее рассчитывают уровень относительной экспрессии гена дефензина альфа, принимая за спонтанную экспрессию уровень, относящийся к контрольной пробе CD8⁺, а за индуцированную экспрессию - уровень, относящийся к пробе CD8⁺, в которую введен стронций, и по индексу экспрессии, который равен отношению индуцированной экспрессии к спонтанной, судят об иммунных нарушениях у пациента, связанных с воздействием стронция, причем при указанном индексе меньше 0,7 прогнозируют развитие иммунодефицитного состояния, а при индексе более 3 - развитие пролиферативного статуса в иммунной системе, при условии одновременного обнаружения у пациента превышения содержания стронция в крови более чем в 1,5 раза по сравнению с фоновым.



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014135360/15, 29.08.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.08.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 29.08.2014

(45) Опубликовано: 27.08.2015 Бюл. № 24

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2180116 C1, 27.02.2002. RU 2092851 C1, 10.10.1997. WO 2011075773 A1, 30.06.2011. ЗАБРОДСКИЙ П.Ф. и др. Нарушение функции субпопуляций Т-лимфоцитов при подостром отравлении токсичными химикатами // Российский химический журнал, 2007, N2, стр.98-100

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),
БУБНОВА Ольга Алексеевна (RU),
ПРЕДЕИНА Регина Атласовна (RU),
ВДОВИНА Надежда Алексеевна (RU),
ЛЫХИНА Татьяна Станиславовна (RU),
ГОРШКОВА Ксения Геннадьевна (RU),
ПИРГОВА Елена Алексеевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное бюджетное учреждение науки "Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения" (ФБУН "ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения") (RU)

(54) СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ИММУННЫХ НАРУШЕНИЙ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ СТРОНЦИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИХ КРИТЕРИЕВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины, а именно к иммунологии, и может быть использовано для прогнозирования развития иммунных нарушений у пациентов, проживающих на территориях с повышенным содержанием стронция в окружающей среде. Для этого производят отбор пробы крови у пациентов с территории с повышенным содержанием стронция в объектах окружающей среды. В указанной пробе определяют содержание стронция в пробе крови пациентов, с содержанием стронция выше фонового значения, определяют содержание лимфоцитов CD8⁺. Далее выделенную фракцию лимфоцитов CD8⁺ делят на две части, одну из которых подвергают инкубации со стронцием, а вторую оставляют в качестве контрольной, причем инкубацию осуществляют путем введения

в пробу CD8⁺ 10 мг/л стронция. Затем определяют в обеих пробах лимфоцитов CD8⁺ количество рибонуклеиновой кислоты РНК путем выделения ее из сепарированных клеток CD8⁺, проводят реакцию обратной транскрипции РНК в дезоксирибонуклеиновую кислоту ДНК, в которой определяют количество гена дефензина альфа, причем при этом определении в качестве внутреннего контроля используют ген домашнего хозяйства GAPDH. Далее рассчитывают уровень относительной экспрессии гена дефензина альфа, принимая за спонтанную экспрессию уровень, относящийся к контрольной пробе CD8⁺, а за индуцированную экспрессию - уровень, относящийся к пробе CD8⁺, в которую введен стронций. И по индексу экспрессии, который равен отношению индуцированной экспрессии к

спонтанной, судят об иммунных нарушениях у пациента, связанных с воздействием стронция. Причем при указанном индексе меньше 0,7 прогнозируют развитие иммунодефицитного состояния, а при индексе более 3 - развитие пролиферативного статуса в иммунной системе, при условии одновременного обнаружения у

пациента превышения содержания стронция в крови более чем в 15 раз, по сравнению с фоновым. Использование данного способа позволяет обеспечить прогнозирование иммунных нарушений, ассоциированных с воздействием стронция, за счет использования иммуногенетических критериев. 2 табл., 3 пр.

Изобретение относится к области медицины, а именно к иммунологии, и может быть использовано для прогнозирования развития иммунных нарушений у пациентов, проживающих на территориях с повышенным содержанием стронция в окружающей среде.

5 Из практики медицины были выявлены некоторые известные методы, использующие в качестве маркера оценки иммунных нарушений иммуногенетический критерий - ген дефензина альфа.

Так, известны диагностические способы для определения прогноза
10 немелкоклеточного рака легкого (Заявка на патент РФ №2012121820), согласно которым выполняют несколько стадий:

а) предоставления тестируемого образца от пациента;

б) определения числа копий маркера исхода злокачественной опухоли в тестируемом образце;

15 с) сравнения числа копий маркера исхода злокачественной опухоли в тестируемом образце с исходным числом копий, равным двум, тем самым определяя присутствие или отсутствие изменения числа копий маркера исхода злокачественной опухоли в тестируемом образце; и

д) исходя из присутствия или отсутствия изменения числа копий маркера исхода злокачественной опухоли в тестируемом образце, идентификации пациента, как
20 имеющего увеличенный риск плохого исхода заболевания по сравнению с исходным показателем исхода заболевания у пациентов, не имеющих изменения числа копий маркера исхода злокачественной опухоли, где присутствие изменения числа копий маркера исхода злокачественной опухоли прогнозирует плохой исход заболевания.

При этом маркер исхода злокачественной опухоли представляет собой Chr 8, 6, 9-8, 8
25 м.п.н. и включает нуклеотидные последовательности, кодирующие: CLDN23 (клаудин 23); DEFA5 (дефензин альфа 5, специфический для клеток Панета); DEFB103B (дефензин бета 103B); DEFB104A (дефензин бета 104A); DEFB104B (дефензин бета 104B); DEFB105B (дефензин бета 105B); DEFB106A (дефензин бета 106A); DEFB106B (дефензин бета 106B); DEFB107A (дефензин бета 107A); DEFB107B (дефензин бета 107B); DEFB4 (дефензин
30 бета 4).

Недостатком известного способа является анализ исключительно спонтанной экспрессии дефензинов. В новом же способе анализируется экспрессия, индуцированная стронцием, что позволяет диагностировать иммуногенетические нарушения, вызванные конкретным фактором, а не только сам эффект или его прогноз.

35 Также известен способ прогнозирования преждевременных родов инфекционного генеза (Патент РФ №2408014). При его реализации с 28 недель беременности проводят исследование эпителия эндоцервикса. В клетках слизистой с помощью обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в реальном времени определяют уровень экспрессии гена противомикробного пептида β -дефензина 1 (HBD1). И при его значении
40 ниже $25,0 \times 10^3$ копий кДНК относительно 10 копий кДНК β -актина прогнозируют преждевременные роды. Способ обеспечивает повышение точности прогнозирования преждевременных родов. Недостатком данного способа является недостаточная специфичность анализируемого субстрата. В предлагаемом же способе производится предварительная сортировка клеточного материала с выделением специфического
45 клеточного фенотипа CD8⁺, ответственного за экспрессию дефензина альфа, уровень которого и идентифицируется.

При этом из уровня техники не были выявлены известные способы оценки иммунных нарушений, ассоциированных с внешнесредовым воздействием стронция, поэтому

сделать выбор ближайшего аналога к заявляемому объекту не представляется возможным.

Технический результат, достигаемый предлагаемым изобретением, заключается в обеспечении возможности прогнозирования иммунных нарушений, ассоциированных с воздействием стронция, за счет использования иммуногенетических критериев, расширения количества информационных показателей, связанных с выделением специфического клеточного фенотипа $CD8^+$, экспрессирующего ген дефензина альфа, и влиянием на него искусственно вводимого стронция, а также связанных с комплексным использованием содержания в крови токсиканта - стронция.

Указанный технический результат достигается предлагаемым способом прогнозирования возникновения иммунных нарушений под воздействием стронция с использованием иммуногенетических критериев, согласно которому производят отбор пробы крови у пациентов с территории с повышенным содержанием стронция в объектах окружающей среды; в указанной пробе определяют содержание стронция, в пробе крови пациентов, с содержанием стронция выше фонового значения, определяют содержание лимфоцитов $CD8^+$ путем сепарации их из клеток крови, далее выделенную фракцию лимфоцитов $CD8^+$ делят на две части, одну из которых подвергают инкубации со стронцием, а вторую оставляют в качестве контрольной, причем инкубацию осуществляют путем введения в пробу $CD8^+$ 10 мг/л стронция, затем определяют в обеих пробах лимфоцитов $CD8^+$ количество рибонуклеиновой кислоты РНК путем выделения ее из сепарированных клеток $CD8^+$, проводят реакцию обратной транскрипции РНК в дезоксирибонуклеиновую кислоту ДНК, в которой определяют количество гена дефензина альфа, причем при этом определении в качестве внутреннего контроля используют ген домашнего хозяйства GAPDH, далее рассчитывают уровень относительной экспрессии гена дефензина альфа, принимая за спонтанную экспрессию уровень, относящийся к контрольной пробе $CD8^+$, а за индуцированную экспрессию - уровень, относящийся к пробе $CD8^+$, в которую введен стронций, и по индексу экспрессии, который равен отношению индуцированной экспрессии к спонтанной, судят об иммунных нарушениях у пациента, связанных с воздействием стронция, причем при указанном индексе меньше 0,7 прогнозируют развитие иммунодефицитного состояния, а при индексе более 3 - развитие пролиферативного статуса в иммунной системе, при условии одновременного обнаружения у пациента превышения содержания стронция в крови более чем в 1,5 раза, по сравнению с фоновым.

Достижимый технический результат обеспечивается за счет следующего.

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.

Известно, что влияние химических токсикантов, в частности стронция, на организм человека приводит к угнетению иммунитета. Стронций оказывает политропное действие на организм человека и животных в эксперименте: поражаются костная ткань, печень и кроветворные органы, обладает гонадотропным, эмбриотоксическим и тератогенным эффектами, что указывает на его генотоксичность (Shepard N. Catalog of Teratogenic Agents. Baltimore, London et al, 1986).

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.

Следует пояснить, что экспрессия генов - это процесс, в ходе которого наследственная информация от гена (последовательности нуклеотидов ДНК) преобразуется в функциональный продукт - РНК или белок. Биосубстрат - лимфоциты проживающих в зоне водной экспозиции стронцием. Причем в качестве клеточного фенотипа в предлагаемом способе отбирались (сепарировались) иммунокомпетентные цитотоксические лимфоциты $CD8^+$, которыми экспрессируются различные защитные белки, в том числе дефензин альфа. Механизм иммунотропного воздействия стронция заключается в его антагонизме по отношению к кальцию. В норме активация Т-лимфоцитов происходит в результате мобилизации внутриклеточного кальция. Хроническая экспозиция стронцием приводит к его инактивации и модификации функциональных процессов в иммунocyтах, основным из которых является экспрессия защитных белков. Причем разрешающие концентрации токсиканта (в частности, стронция) могут как стимулировать экспрессию, так и угнетать ее. В качестве эндогенного внутреннего контроля, относительно которого проводили нормализацию продуктов амплификации исследуемых генов в заявляемом способе, был выбран ген GAPDH (ген домашнего хозяйства).

Индукцированная экспрессия осуществлялась пороговой концентрацией стронция. Благодаря тому что при реализации заявляемого способа в опытную пробу $CD8^+$ лимфоцитов дополнительно добавляют стронций в терапевтической концентрации, т.е. концентрации, оказывающей минимальный действующий эффект, обеспечивается возможность усилить и идентифицировать эффект воздействия этого токсиканта на процесс экспрессии $CD8^+$ клеточным фенотипом гена, реализующего иммунную резистентность, т.к. чем выше содержание этого токсиканта над нормальной, допустимой (соответствующей принятой предельно допустимой концентрации ПДК в воде) концентрацией (а это содержание на этапе идентификации в предлагаемом способе будет складываться из базового, ранее содержащегося в пробе крови стронция, и из дополнительно введенной терапевтической концентрации стронция - 10 мг/л), тем значительнее его модифицирующее действие на процесс экспрессии защитных белков, в частности дефензина альфа, а значит, благодаря внесению фиксированной терапевтической концентрации стронция *ex vivo* повысится точность определения влияния указанного токсиканта - стронция, на нарушение функционирования генетического аппарата клетки.

Кроме того, имеющаяся хроническая внешнесредовая (водная) экспозиция стронцием формирует мутагенный (эпигеномный) эффект, который реализуется (проявляется) разрешающей действующей концентрацией токсиканта.

Результаты (приведенные внутренним контролем):

1. Относительное количество белка (РНК) дефензина альфа (спонтанный уровень экспрессии $CD8^+$).

2. Индуцированный стронцием уровень экспрессии белка (РНК) дефензина альфа (индуцированный уровень экспрессии $CD8^+$).

Прогнозирование производится по соотношению индуцированного стронцием и спонтанного уровней экспрессии дефензина альфа.

Состояние специфической индуцибельности оценивалось по величине и направлению изменчивости экспрессии, вызванной экспозицией стронцием *ex vivo* по сравнению со спонтанной экспрессией с учетом базовой экспозиции (содержание стронция в крови).

Диагностический критерий: экспонированное стронцием увеличение более чем в 3 раза или снижение относительного уровня экспрессии специфических иммунотропных генов (дефензин альфа) более чем в 1,5 раза по сравнению со спонтанным уровнем экспрессии на фоне более чем 1,5-кратного превышения фонового уровня стронция в крови, позволяет прогнозировать развитие иммуноопосредованных патологических нарушений, приводящих либо к иммунодефициту, как результат угнетения (снижения) экспрессии, либо - к иммунопролиферативным состояниям, как результат стимуляции (увеличения) экспрессии, опосредованным стронцием.

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. На территории с повышенным содержанием стронция в объектах окружающей среды отбирали пациентов, проживающих постоянно на данной территории.

2. Проводили у них забор пробы цельной крови в специальные пробирки с антикоагулянтом (использовали тризол - для стабилизации РНК, и ЭДТА (Этилендиаминтетрауксусная кислота) (0,05М раствор ЭДТА в соотношении 500 мкл крови на 50 мкл антикоагулянта) - для выделения клеток крови и изучения маркеров клеточной дифференцировки.

3. В цельной крови пациентов определяли содержание стронция традиционным методом масс-спектрометрии.

4. Выделяли пациентов с содержанием стронция в крови выше фонового значения (в примере конкретного осуществления на территории г. Кунгур Пермского края фоновым значением был показатель, равный $0,024 \pm 0,007$ мг/дм³).

5. У указанных пациентов проводили сепарацию из цельной крови субпопуляции клеток лимфоцитов с маркером CD8+ методом иммуномагнитной сепарации на сортере autoMACS Pro (Германия). Проводили ее идентификацию методом проточной цитофлюориметрии на цитометре FacsCalibur (BD, США). Чистота выделенных клеток была подтверждена методом проточной цитофлюориметрии и составила 95-98%.

Устанавливали содержание клеток лимфоцитов CD8⁺ в пробе крови.

6. Выделенную фракцию лимфоцитов CD8⁺ делили на две части.

7. Одну часть подвергали инкубации посредством 12-ти часовой экспозиции со стронцием (опытные пробы). Другую часть не подвергали воздействию стронция, вместо него добавляли физраствор (контрольные пробы). При инкубации использовали соли стронция в конечной концентрации 10 мг/л (концентрация стронция для инкубации была установлена опытным путем, исходя из следующего: ПДК стронция в воде составляет 7 мг/л, терапевтические дозы стронция в основном находятся в диапазоне от 7 до 15 мг/кг (данные по стронцию ранелату) и показатель 10 мг/л является примерно в 1,5 раза выше допустимого уровня, т.е. будет являться действующей концентрацией).

8. Затем из обеих проб отсепарированных клеток CD8⁺ выделяют клеточную РНК в несколько этапов с использованием набора для выделения РНК Tempus Spin RNA purification kit (Life Technologies, USA).

Первый этап - лизис клеток, денатурация РНК и связывание с тРНК.

- В чистые полипропиленовые пробирки типа Эппендорфф объемом 1,5 мл вносят по 3 мкл тРНК и 450 мкл денатурирующего раствора (0,1 %-ный раствор фенола).

Второй этап - выделение РНК из сепарированных клеток CD8⁺, осаждение РНК.

- Добавить 50 мкл взвеси клеток CD8⁺ в соответствующие пробирки, используя наконечники с фильтрами. Параллельно необходимо выполнить выделение РНК из контрольных образцов, прилагающихся к набору (положительный и отрицательный контрольные образцы), для этого в одну пробирку добавить 50 мкл положительного контрольного образца, во вторую пробирку - 50 мкл деионизированной воды - отрицательный контрольный образец. Пробирки плотно закрыть.

- Тщательно перемешать на вортексе в течение 10 секунд, а затем инкубировать при комнатной температуре 10 минут.

- Центрифугировать в течение 15 секунд при 12 тыс.об/мин.

- Добавить 100 мкл хлороформа, плотно закрыть пробирки и перемешать на вортексе 5 секунд при 400 об/мин.

- Центрифугировать 5 минут при 12 тыс.об/мин.

- Перенести до 300 мкл верхней водной фазы в чистую полипропиленовую пробирку типа Эппендорфф объемом 1,5 мл, содержащую 300 мкл изопропилового спирта, используя наконечники с фильтрами. Перемешать на вортексе 5 секунд.

- Центрифугировать 12 минут при 12 тыс.об/мин. В результате данной манипуляции образуется полупрозрачный рыхлый осадок.

- Удалить супернатант вакуумным аспиратором в колбу-ловушку, с использованием одноразовых наконечников, оставляя на дне пробирки около 20 мкл жидкости.

Третий этап - отмывка РНК.

- В пробирку с осадком добавить 1 мл промывочного раствора (70%-ный раствор этилового спирта). Пробирки плотно закрыть, перемешать на вортексе и центрифугировать 10 минут при 12 тыс.об/мин.

- Удалить супернатант как можно полнее вакуумным аспиратором в колбу-ловушку, не захватив при этом осадок. Осадок подсушить 20-30 минут при комнатной температуре, оставляя пробирки открытыми.

- Добавить 50 мкл деионизированной воды, пробирки закрыть, инкубировать 10 минут при комнатной температуре, затем перемешать встряхиванием.

Готовые пробы РНК аликвотировали и замораживали при -80°C.

Концентрацию и чистоту препаратов РНК определяли спектрофотометрически при длинах волн 260, 280 и 230 нм.

9. Проводят процесс обратной транскрипции (далее - ОТ) РНК в ДНК.

Реакцию ОТ проводили в реакционной смеси с конечным объемом 20 мкл, приготовленной на деионизированной стерильной воде для молекулярной биологии (MQ), содержащей 67 mM Трис-НCl (pH 8,8), 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, 4 mM MgCl₂, 1 mM каждого dNTP, 3,2 мкг смеси праймеров со случайной последовательностью, 10 mM дитиотреитола, 10 единиц активности ингибитора рибонуклеаз RiboLock, 30 ед. рекомбинантной обратной транскриптазы M-MLV из набора для обратной транскрипции High Capacity RNA to cDNA kit (Life Technologies, USA), и 1 мкг тотальной РНК. Смесь инкубировали при 42°C в течение 1 часа. Реакцию останавливали путем тепловой инактивации обратной транскриптазы, выдерживая смесь при 94°C в течение 10 мин.

Проводили полимеразную цепную реакцию (ПНР) с праймерами к генам дефензина альфа (DEF), причем в качестве внутреннего контроля использовали ген домашнего хозяйства - глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH).

ПНР проводили в реакционной смеси с конечным объемом 50 мкл, содержащей 67 mM Трис-НCl (pH 8,8), 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM каждого dNTP, 15 пкмоль каждого из пары праймеров с заданной последовательностью, 2,5 ед.

рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы, 5 мкл реакционной ОТ-смеси, содержащей кДНК. Для амплификации к ДНК использовали последовательности специфических праймеров для GAPDH [Hirohashi Y., et al., 2002]. Праймеры были подобраны на основе зонда TaqMan для мультиплексной ПЦР. Уровень флюоресценции оценивали в режиме

реального времени на детектирующем амплификаторе CFX-96 фирмы Bio-Rad (США).
10. Расчет уровня относительной экспрессии гена дефензина проводили на программном обеспечении CFX Manager (Bio-Rad, США).

Уровни экспрессии исследуемых генов нормализовали по отношению к уровню экспрессии гена домашнего хозяйства (GAPDH), который принимали за единицу.

Статистический анализ проводили с использованием программ Statistica v7.1. Для обнаружения различий между группами применяли непараметрический критерий Манна-Уитни (U-тест). Для оценки связи между экспрессиями анализируемого гена рассчитывали коэффициент ранговой корреляции Спирмана. Статистически достоверными различия принимали при уровне значимости $p < 0,05$.

11. Далее находили индекс экспрессии, который равен отношению индуцированной экспрессии к спонтанной, по которому судили об иммунных нарушениях у пациента, ассоциированных с воздействием стронция (принимали за спонтанную экспрессию уровень, относящийся к контрольной пробе $CD8^+$, а за индуцированную экспрессию - уровень, относящийся к пробе $CD8^+$, в которую введен стронций). При указанном индексе меньше 0,7 прогнозировали угнетение экспрессии и развитие иммунодефицитного состояния, а при индексе более 3 - увеличение экспрессии и развитие пролиферативного статуса в иммунной системе, при условии одновременного обнаружения у пациента превышения содержания стронция в крови более чем в 1,5 раза, по сравнению с фоновым.

В ходе исследований было обследовано 30 пациентов с территории г. Кунгур Пермского края, где содержание стронция в объектах окружающей среды превышало фоновый в 1,6 раза. У 6 пациентов содержание стронция в крови превышало фоновый в 1,5 раза и более. У указанных пациентов и была в дальнейшем исследована экспрессия гена дефензина альфа (иммуногенетический критерий). В качестве группы сравнения послужили пациенты, проживающие вне стронциевой геохимической провинции. Данные, полученные в ходе опытов, приведены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Характеристика индекса экспрессии гена дефензина альфа у пациентов с условно чистой территории и уровнем содержания стронция в крови, не превышающим региональный фоновый ($0,024 \pm 0,007$ мкг/дм³) или превышающий его менее, чем в 1,5 раза

№ №	Пациент возраст	Экспрессия			Содержание CD8 ⁺ , %	Концентрация стронция в крови, мкг/мл
		Спонтанная	Индукцированная стронцием	Индекс экспрессии		
1	40	0,0076	0,01718	2,26	24	0,0181
2	44	0,0115	0,0121	1,05	26	0,012
3	41	0,0515	0,1429	2,8	28	0,0216
4	46	0,072	0,19541	2,71	29	0,0347
5	50	0,02420	0,0394	1,63	32	0,032
6	41	0,033	0,05215	1,58	28	0,0201
7	Норма			0,7-3,0	$28,0 \pm 4,7$	$0,024 \pm 0,007$

Таблица 2. Характеристика индекса экспрессии гена дефензина альфа у пациентов с уровнем содержания стронция в крови, превышающим региональный фоновый ($0,024 \pm 0,007$ мкг/дм³) в 1,5 раза и более

№ №	Пациент возраст	Экспрессия			Содержание CD8 ⁺ , %	Концентрация стронция в крови, мкг/мл
		Спонтанная	Индукцированная стронцием	*Индекс экспрессии		
1	47	0,0093	0,422	45,4	40	0,121
2	45	0,0174	0,291	16,7	38	0,124
3	49	0,0622	0,2349	3,8	35	0,123
4	46	0,0104	0,007	0,67	17	0,0605
5	49	0,603	0,359	0,60	14	0,0862
6	41	0,1285	0,085	0,66	21	0,0553
7	Норма			0,7-3,0	$28 \pm 4,7$	$0,024 \pm 0,007$

*Примечание: Значения индексов экспрессии достоверно отличались от аналогичных данных в группе пациентов с уровнем содержания стронция в крови ниже фонового ($p < 0,05$)

В таблице 2 приведены данные об индексе экспрессии гена дефензина альфа для пациентов, проживающих на экологически неблагополучной территории и в крови которых концентрация стронция превышала региональный фоновый показатель более чем в 1,5 раза.

Причем приведенные значения спонтанной и индуцированной экспрессии и предлагаемого индекса достоверно отличались от аналогичных данных в группе пациентов, проживающих на территории без техногенной экспозиции стронцием ($p < 0,05$). Данные, полученные у пациентов с высоким уровнем стронция в крови (таблица 2) в биопробах, содержащих CD8⁺ Т-лимфоциты, показали либо повышение индекса экспрессии гена дефензина альфа после инкубации со стронцием более 3, или его снижение в аналогичных биопробах менее 0,7. Кроме того, у пациентов с высоким уровнем стронция в крови и повышенным уровнем экспрессии дефензима альфа CD8⁺ клетками было повышено содержание CD8⁺ Т-лимфоцитов в крови, в то время как у

пациентов с высоким уровнем стронция и сниженным уровнем экспрессии дефензима CD8⁺ клетками наблюдалось снижение содержания CD8⁺ Т-лимфоцитов в крови, что указывает на наличие и направленность иммунных нарушений у этих пациентов.

Для обоснования пороговости индекса экспрессии, который бы характеризовал иммунные нарушения у пациента, исходили из следующего принципа.

Принцип пороговости предполагает разрыв между пороговыми (минимально действующими) уровнями фактора и недействующими с коэффициентом 3 и выше. Ряд авторов (Трифонов Е.А. и др. Acta nature Т.6, - №2(31). - 2014) считают значимым изменение уровня экспрессии гена более чем в 1,5 раза, хотя они же идентифицируют повышение ее интенсивности у женщин с преэклампсией в 6-8 раз. Поэтому в предлагаемом способе рекомендуется в качестве диагностически значимого критерия измененной экспрессии снижение ее в 1,5 раза, как критический уровень угнетения экспрессии гена, и индекс 3,0, как порог допустимого увеличения экспрессии гена, что будет выражаться диапазоном коэффициентов оптимума экспрессии (индекс экспрессии) от 0,7 до 3,0. Разница между коэффициентами, ограничивающими увеличение и снижение экспрессии генов, объясняется особенностями и интенсивностью этих процессов у эукариотов, режим сохранения генетического материала при супрессии и инициация синтеза при стимуляции (достигается путем многократной инициации синтеза ДНК) приводит в последнем случае к значительному увеличению генетического материала.

Для иллюстрации реализации предлагаемого способа приведены три примера по конкретным пациентам одного возраста и пола из группы пациентов с повышенным содержанием стронция в крови и с содержанием стронция в пределах фоновой концентрации.

Пример 1. Пациент, 47 лет. Определяется уровень стронция в крови выше фоновых уровней - 0,121 мг/дм³. Значение клеточного фенотипа CD8⁺: 40%. Отношение уровня стронция в крови к его фоновому уровню=5,04. Значение индекса экспрессии=45,4 (т.е. выше 3). Таким образом, при анализе клеточных фенотипов, отвечающих за иммунорезистентность, выявлен их повышенный уровень, что в ассоциации с высокой контаминацией биосред стронцием и активацией экспрессии специфического гена указывает на наличие пролиферативного статуса в иммунной системе пациента, обусловленного действием стронция.

Пример 2. Пациент, 49 лет. Определяется уровень стронция в крови выше фоновых уровней - 0,086 мг/дм³. Значение клеточного фенотипа CD8⁺: 14%. Отношение уровня стронция в крови к его фоновому уровню=3,58. Значение индекса экспрессии=0,6 (т.е. ниже 0,7). Таким образом, при анализе клеточных фенотипов, отвечающих за иммунорезистентность, выявлен их дефицит, что в ассоциации с высокой контаминацией биосред стронцием и угнетением экспрессии дефензина альфа указывает на наличие иммунодефицитного состояния в иммунной системе пациента, обусловленного действием стронция.

Пример 3. Пациент, 40 лет. Определяется уровень стронция в крови в пределах фоновых уровней - 0,0181 мг/дм³. Значение клеточного фенотипа CD8⁺: 24%. Отношение уровня стронция в крови к его фоновому уровню=0,75. Значение индекса экспрессии=2,26 (т.е. в диапазоне 0,7-3,0). Таким образом, при анализе ответственных за иммунорезистентность клеточных фенотипов и экспрессию ими защитных белков в ответ на индукцию стронцием иммуногенетических нарушений, обусловленных действием стронция, выявлено не было.

Таким образом, приведенные данные показывают, что при реализации предлагаемого

способа с использованием предлагаемых диапазонов индекса экспрессии дефензина альфа обеспечивается его назначение.

Формула изобретения

5 Способ прогнозирования возникновения иммунных нарушений под воздействием стронция с использованием иммуногенетических критериев, характеризующийся тем, что производят отбор пробы крови у пациентов с территории с повышенным содержанием стронция в объектах окружающей среды; в указанной пробе определяют содержание стронция, в пробе крови пациентов, с содержанием стронция выше фонового
10 значения, определяют содержание лимфоцитов CD8⁺ путем сепарации их из клеток крови, далее выделенную фракцию лимфоцитов CD8⁺ делят на две части, одну из которых подвергают инкубации со стронцием, а вторую оставляют в качестве контрольной, причем инкубацию осуществляют путем введения в пробу CD8⁺ 10 мг/л
15 стронция, затем определяют в обеих пробах лимфоцитов CD8⁺ количество рибонуклеиновой кислоты РНК путем выделения ее из сепарированных клеток CD8⁺, проводят реакцию обратной транскрипции РНК в дезоксирибонуклеиновую кислоту ДНК, в которой определяют количество гена дефензина альфа, причем при этом
20 определении в качестве внутреннего контроля используют ген домашнего хозяйства GAPDH, далее рассчитывают уровень относительной экспрессии гена дефензина альфа, принимая за спонтанную экспрессию уровень, относящийся к контрольной пробе CD8⁺, а за индуцированную экспрессию - уровень, относящийся к пробе CD8⁺, в которую введен стронций, и по индексу экспрессии, который равен отношению индуцированной
25 экспрессии к спонтанной, судят об иммунных нарушениях у пациента, связанных с воздействием стронция, причем при указанном индексе меньше 0,7 прогнозируют развитие иммунодефицитного состояния, а при индексе более 3 - развитие пролиферативного статуса в иммунной системе, при условии одновременного обнаружения у пациента превышения содержания стронция в крови более чем в 1,5
30 раза по сравнению с фоновым.

35

40

45