

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **035077**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.04.24**

**(51)** Int. Cl. **C12Q 1/68** (2018.01)  
**G01N 33/48** (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201700401**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.08.14**

---

**(54) СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РИСКА РАЗВИТИЯ СИНТРОПИИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ И МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА**

---

**(43)** 2019.02.28

**(96)** 2017000068 (RU) 2017.08.14

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ "НАУЧНО  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ИНСТИТУТ МЕДИЦИНЫ ТРУДА  
ИМЕНИ АКАДЕМИКА Н.Ф.  
ИЗМЕРОВА" (ФГБНУ "НИИ МТ")  
(RU)**

**(56)** AYNACIOGLU A. S. et al. Population frequency, mutation linkage and analytical methodology for the Arg16Gly, Gln27Glu and Thr164Ile polymorphisms in the  $\beta_2$ -adrenergic receptor among Turks. J Clin Pharmacol, 1999, 48, pp. 761-764

TURNER S. W. et al.  $\beta_2$  adrenoceptor Arg16Gly polymorphism, airway responsiveness, lung function and asthma in infants and children. Clinical and Experimental Allergy 2004; 34:1043-1048

BRUMPTON Ben Michael et al. Metabolic syndrome and incidence of asthma in adults: the HUNT study. Eur Respir J 2013; 42: 1495-1502

МИНУШКИНА Л. О. и др. Генетический полиморфизм генов цитокинов системы воспаления и состояние сосудистой стенки у больных артериальной гипертензией. Артериальная Гипертензия, 2017;23(2):103-111  
EP-A2-1210426

**(72)** Изобретатель:  
**Кузьмина Людмила Павловна,  
Бухтияров Игорь Валентинович,  
Хотулева Анастасия Григорьевна  
(RU)**

---

**(57)** Изобретение относится к способу прогнозирования риска развития синтропии бронхиальной астмы и метаболического синдрома, включающему выявление полиморфизма Arg16Gly гена  $\beta_2$ -адренергического рецептора и полиморфизма C3872T гена С-реактивного белка.

---

**B1**

**035077**

**035077  
B1**

Изобретение относится к медицине и может быть использовано для прогнозирования риска развития синтропии бронхиальной астмы и метаболического синдрома.

Известен способ прогнозирования риска развития синтропии бронхиальной астмы и метаболического синдрома, включающий забор венозной крови, получение сыворотки и определение количественного содержания витамина D (см. Горемыкина М.С., Космынина М.А., Купаев В.И. Влияние витамина D на генез бронхиальной астмы в сочетании с метаболическим синдромом. Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2014. Том 16, №5 (2), с. 776-778).

Однако данный способ осуществляет прогнозирование риска развития синтропии бронхиальной астмы и метаболического синдрома только на основе способности витамина D воздействовать на клеточный и гуморальный иммунитет, уменьшая процесс воспаления, не учитывая другие патогенетические механизмы, играющие важную роль в развитии синтропии бронхиальной астмы и метаболического синдрома, например роль нарушения функционирования  $\beta$ 2-адренергических рецепторов и не учитывая воздействие на организм человека факторов производственной среды, которые осуществляют запуск патофизиологических механизмов воспаления дыхательных путей и неспецифической гиперреактивности бронхов, что имеет место при прогнозировании риска развития синтропии бронхиальной астмы и метаболического синдрома на начальном этапе развития заболевания в процессе предварительных или периодических медицинских осмотров в условиях дефицита времени большого количества работающих или поступающих на работу на аллергоопасные производства.

Задачей настоящего изобретения является повышение достоверности прогнозирования риска развития синтропии бронхиальной астмы и метаболического синдрома при воздействии производственных факторов сенсibiliзирующего и раздражающего действия на начальном этапе развития заболевания в процессе предварительных или периодических медицинских осмотров в условиях дефицита времени большого количества работающих или поступающих на работу на аллергоопасные производства.

Техническим результатом изобретения является своевременное обеспечение возможности проведения патогенетически обоснованной профилактики и лечения работников аллергоопасных производств для предотвращения развития и/или прогрессирования патологического процесса при развитии синтропии профессиональной бронхиальной астмы и метаболического синдрома.

Указанная задача достигается тем, что в известном способе прогнозирования риска развития синтропии бронхиальной астмы и метаболического синдрома, включающем забор венозной крови, выделение ДНК, проведение полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами для выявления полиморфизма Arg16Gly гена  $\beta$ 2-адренергического рецептора и полиморфизма C3872T гена С-реактивного белка, причем обнаружение одновременно генотипа Arg/Arg гена  $\beta$ 2-адренергического рецептора и генотипа ТТ гена С-реактивного белка указывает на высокий риск развития синтропии бронхиальной астмы и метаболического синдрома при воздействии производственных факторов сенсibiliзирующего и раздражающего действия.

Полиморфизм гена  $\beta$ 2-адренергического рецептора, приводящий к изменению аминокислотной последовательности белка, может вызывать значительные конформационные и структурные изменения, нарушающие нормальную работу рецептора, что является важным механизмом бронхообструкции - главного патофизиологического феномена бронхиальной астмы. Также  $\beta$ 2-адренергические рецепторы являются частью симпатической нервной системы, которая принимает участие в метаболизме липидов через действие катехоламинов, что играет роль в развитии ожирения. В нарушении функции  $\beta$ 2-адренергических рецепторов играют роль и некоторые производственные факторы сенсibiliзирующего и раздражающего действия (например, изоцианаты, применяемые при изготовлении клея, красок, искусственных волокон, полимерных материалов, пликатиновая кислота, содержащаяся в пыли красного кедра и др.), которые блокируют  $\beta$ 2-адренергические рецепторы бронхов. Наличие генотипа Arg/Arg гена  $\beta$ 2-адренергического рецептора является фактором риска развития синтропии бронхиальной астмы и метаболического синдрома в связи с нарушением функционирования  $\beta$ 2-адренергических рецепторов.

Полиморфизм гена С-реактивного белка ассоциирован с более высоким уровнем данного маркера воспаления, обладающего провоспалительным эффектом, что способствует активации воспалительного процесса в ответ на воздействие производственных факторов, обладающих сенсibiliзирующим и раздражающим действием. Повышенные уровни СРБ приводят к инсулинорезистентности и лептинорезистентности, которая является одним из главных патогенетических механизмов развития всех компонентов метаболического синдрома (ожирение, инсулинорезистентность, дислипидемия, артериальная гипертензия). Также повышенные уровни лептина при лептинорезистентности способны активировать и поддерживать воспаление в бронхах путем повышения продукции провоспалительных цитокинов, повышения синтеза мощных бронхоконстрикторов - лейкотриенов и простагландинов макрофагами, стимуляции миграции эозинофилов, хемотаксиса нейтрофилов, освобождение которыми кислородных радикалов повышают выраженность воспалительного процесса, и снижения активности и пролиферации регуляторных Т-лимфоцитов. Наличие генотипа ТТ гена С-реактивного белка является фактором риска развития синтропии бронхиальной астмы и метаболического синдрома в связи с повышением активности воспа-

лительного процесса, лежащего в основе развития синтропии бронхиальной астмы и метаболического синдрома.

Таким образом, одновременное наличие генотипа Arg/Arg гена  $\beta$ 2-адренергического рецептора и генотипа TT гена С-реактивного белка позволяет прогнозировать высокий риск развития синтропии бронхиальной астмы и метаболического синдрома при воздействии производственных факторов сенсibiliзирующего и раздражающего действия в связи с одновременным нарушением функционирования  $\beta$ 2-адренергических рецепторов и регуляции воспалительного ответа.

Анализ патентных и научно-технических информационных источников показал, что предлагаемый способ неизвестен и не следует явным образом из изученного уровня техники, т.е. соответствует критериям "новизна" и "изобретательский уровень".

Предлагаемый способ может быть применен в клинических, биохимических и молекулярно-генетических лабораториях, укомплектованных общедоступным оборудованием, выпускаемым отечественной или зарубежной промышленностью.

Следовательно, заявленный способ является доступным и практически применимым.

Предлагаемый способ осуществляют следующим образом.

У пациентов осуществляют забор венозной крови. Из цельной крови выделяют ДНК с использованием, например, комплекта реагентов для экстракции ДНК из клинического материала "Ампли Прайм ДНК-сорб-В" в соответствии с инструкцией к используемому комплекту.

Из полученного препарата ДНК (объемом 50 мкл) готовят серии разведений в ТЕ-буфере до конечной концентрации (1-3) нг/мкл. Данный раствор ДНК используют для постановки полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами.

Выявление полиморфизма Arg16Gly гена  $\beta$ 2-адренергического рецептора проводят с помощью наборов, например, НПФ "Литех", Россия. При этом используют набор реагентов "SNP-экспресс-shot"-РВ: разбавитель, реакционная смесь, Taq-полимераза. Объем амплификационной смеси - 25 мкл.

Полимеразную цепную реакцию проводят по следующей программе.

При использовании амплификатора "CFX 96" (BioRad, США) выдерживают пробирки при +94°C - 3 мин, затем 40 циклов: при 94°C - 15 с, при 64°C - 40 с. При этом используют каналы FAM и HEX. Детекция продуктов амплификации осуществляют на каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала: по каналу FAM - для аллели Gly, по каналу HEX - для аллели Arg.

Выявление полиморфизма С3872Т гена С-реактивного белка проводят с помощью наборов, например, НПФ "Литех", Россия. При этом используют набор реагентов "SNP-экспресс": разбавитель, реакционная смесь, Taq-полимераза. Объем амплификационной смеси - 25 мкл.

Реакцию амплификации проводят по следующей программе.

При использовании термоциклера T 100 Thermal Cycler (BioRad, США) выдерживают пробирки при +93°C - 1 мин, затем 35 циклов: при 93°C - 10 с, при 64°C - 10 с, при 72°C - 20 с, а в конце при 72°C - 1 мин. После проведения амплификации осуществляют анализ продуктов реакции в 3% агарозном геле с окраской бромистым этидием и визуализацией в проходящем УФ-свете.

Обнаружение одновременно генотипа Arg/Arg гена  $\beta$ 2-адренергического рецептора и генотипа TT гена С-реактивного белка указывает на высокий риск развития синтропии бронхиальной астмы и метаболического синдрома при воздействии производственных факторов сенсibiliзирующего и раздражающего действия.

Пример 1.

Большая Г., 64 года.

После 15 лет работы маляром в контакте с комплексом веществ, обладающих сенсibiliзирующим и раздражающим действием на основании профмаршрута, данных санитарно-гигиенической характеристики условий труда, наличия положительного симптома элиминации по отношению к производственному фактору, результатов иммунологического обследования и специфического аллергологического тестирования у данной пациентки была диагностирована профессиональная бронхиальная астма. У больной отмечено прогрессирование астмы с учащением обострений, утяжелением приступов удушья и нарастанием дыхательной недостаточности. Состояние пациентки в значительной мере отяготилось за счет синтропии профессиональной астмы с метаболическим синдромом.

Клинический диагноз. Основной: профессиональная бронхиальная астма аллергическая и неаллергическая, тяжелого течения, гормонозависимая, частично контролируемая. Эмфизема легких. Дыхательная недостаточность 2-3 степени. Сопутствующий: гипертоническая болезнь III ст., 3 ст., риск 4. Метаболический синдром: ожирение, абдоминально-висцеральный тип, дислипидемия, жировая инфильтрация печени 2 ст. и поджелудочной железы, гипергликемия натощак.

ИМТ 34,3 кг/м<sup>2</sup> (ожирение 1 степени). Показатели ФВД, % от должн.: ФЖЕЛ -77%, ОФВ1 - 55%, Индекс Тиффно - 63%, МОС75% - 32%, МОС50% - 27%, МОС25% - 34%. Лабораторные показатели в сыворотке крови: глюкоза - 8,7 ммоль/л (референтные пределы 3,9-6,1 ммоль/л), холестерин - 8,0 ммоль/л (рекомендуемые значения менее 5 ммоль/л), триглицериды - 0,79 ммоль/л (референтные значе-

ния менее 1,7 ммоль/л), ЛПВП - 1,6 ммоль/л (референтные значения для женщин более 1,29 ммоль/л), ЛПНП - 5,26 ммоль/л (референтные значения до 3 ммоль/л), индекс атерогенности - 4 (референтные значения менее 3), С-реактивный белок - 5,9 мг/л (референтные пределы 0,5 - 5 мг/л), лептин - 115,6 нг/мл (референтные пределы для женщин 1,1-27,6 нг/мл), инсулин - 8,5 мкЕД/мл (референтные пределы 0,7-9 мкЕД/мл), индекс инсулинорезистентности НОМА - 3,29 (референтные значения менее 2,77), IgE - 665 МЕ/мл (референтные значения менее 120 МЕ/мл).

Кровь больной Г. исследовали в соответствии с предлагаемым способом.

Из цельной крови выделили ДНК с использованием комплекта реагентов для экстракции ДНК из клинического материала "Ампли Прайм ДНК-сорб-В" в соответствии с инструкцией к используемому комплекту.

Из полученного препарата ДНК (объемом 50 мкл) приготовили серию разведений в ТЕ-буфере до конечной концентрации (1-3) нг/мкл. Данный раствор ДНК использовали для постановки реакции амплификации со специфическими праймерами.

Выявление полиморфизма Arg16Gly гена  $\beta$ 2-адренергического рецептора проводили с помощью набора реагентов "SNP-экспресс-shot"-РВ НПФ "Литех", Россия: разбавитель, реакционная смесь, Taq-полимеразы. Объем амплификационной смеси - 25 мкл.

Полимеразную цепную реакцию проводили по следующей программе.

При использовании амплификатора "CFX 96" (BioRad, США) выдерживали пробирки при +94°C - 3 мин, затем 40 циклов: при 94°C - 15 с, при 64°C - 40 с. При этом использовались каналы FAM и HEX. Детекция продуктов амплификации осуществлялась на каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа построила кривые накопления флуоресцентного сигнала: по каналу FAM - для аллели Gly, по каналу HEX - для аллели Arg.

Генотипирование полиморфизма С3872Т гена С-реактивного белка проводили с помощью набора реагентов "SNP-экспресс" НПФ "Литех", Россия: разбавитель, реакционная смесь, Taq-полимеразы. Объем амплификационной смеси - 25 мкл.

Реакцию амплификации проводили по следующей программе.

При использовании термоциклера T 100 Thermal Cycler (BioRad, США) выдерживали пробирки при +93°C - 1 мин, затем 35 циклов: при 93°C - 10 с, при 64°C - 10 с, при 72°C - 20с, а в конце при 72°C - 1 мин. После проведения амплификации осуществляли анализ продуктов реакции в 3% агарозном геле с окраской бромистым этидием и визуализацией в проходящем УФ-свете.

При анализе результатов проведенного исследования были выявлены генотип Arg/Arg гена  $\beta$ 2-адренергического рецептора и генотип ТТ гена С-реактивного белка.

Вывод: генотип Arg/Arg гена  $\beta$ 2-адренергического рецептора свидетельствует о генетически обусловленном нарушении функции  $\beta$ 2-адренорецепторов, генотип ТТ гена С-реактивного белка свидетельствует о генетически детерминированной повышенной активности воспалительных процессов. Таким образом, у данной пациентки выявлен высокий риск развития синтропии бронхиальной астмы и метаболического синдрома при воздействии производственных факторов сенсibiliзирующего и раздражающего действия. У данной пациентки это подтвердило в дальнейшем развитие синтропии профессиональной бронхиальной и метаболического синдрома, включающего абдоминальное ожирение, артериальную гипертензию, инсулинорезистентность и дислипидемию, и тяжелое течение профессиональной бронхиальной астмы, дыхательная недостаточность 2-3 степени. Из лабораторных исследований также обращают на себя внимание гиперлептинемия и значительное повышение иммуноглобулина Е, что также свидетельствует о тяжести состояния пациентки.

Пример 2.

Больная Х., 65 лет.

После 20 лет работы мастером цеха по обработке меха в контакте с комплексом веществ сенсibiliзирующего и раздражающего действия (пыль меха, урсол, антисептики, нафталин, др. фумигаторы и пр.) на основании профмаршрута, данных санитарно-гигиенической характеристики условий труда, наличия положительного симптома элиминации по отношению к производственному фактору, результатов иммунологического обследования и специфического аллергологического тестирования с урсолом, антигенами шерсти животных у данной пациентки была диагностирована профессиональная бронхиальная астма. Состояние пациентки неотягощено наличием метаболического синдрома.

Клинический диагноз. Основной: профессиональная бронхиальная астма аллергическая и неаллергическая, средней степени тяжести, частично контролируемая. Эмфизема легких. Дыхательная недостаточность 1-2 степени. Сопутствующий: гипертоническая болезнь II ст., 2 ст., риск 2.

ИМТ 23,8 кг/м<sup>2</sup> (нормальная масса тела). Показатели ФВД, % от должн.: ФЖЕЛ - 71%, ОФВ1 - 73%, Индекс Тиффно - 86%, МОС75% - 53%, МОС50% - 46%, МОС25% - 64%. Лабораторные показатели в сыворотке крови: глюкоза - 5,8 ммоль/л (референтные пределы 3,9-6,1 ммоль/л), холестерин - 5,4 ммоль/л (рекомендуемые значения менее 5 ммоль/л), триглицериды - 0,79 ммоль/л (референтные значения менее 1,7 ммоль/л), ЛПВП - 2,24 ммоль/л (референтные значения для женщин более 1,29 ммоль/л), ЛПНП - 2,7 ммоль/л (референтные значения до 3 ммоль/л), индекс атерогенности - 1,4 (референтные зна-

чения менее 3), С-реактивный белок - 11,6 мг/л (референтные пределы 0,5-5 мг/л), лептин - 26,5 нг/мл (референтные пределы для женщин 1,1-27,6 нг/мл), инсулин - 3,2 мкЕД/мл (референтные пределы 0,7-9 мкЕД/мл), индекс инсулинорезистентности НОМА - 0,82 (референтные значения менее 2,77), IgE - 160 МЕ/мл (референтные значения менее 120 МЕ/мл).

Кровь больной Х. исследовали в соответствии с предлагаемым способом.

Из цельной крови выделили ДНК с использованием комплекта реагентов для экстракции ДНК из клинического материала "Ампли Прайм ДНК-сорб-В" в соответствии с инструкцией к используемому комплекту.

Из полученного препарата ДНК (объемом 50 мкл) приготовили серию разведений в ТЕ-буфере до конечной концентрации (1-3) нг/мкл. Данный раствор ДНК использовали для постановки реакции амплификации со специфическими праймерами.

Выявление полиморфизма Arg16Gly гена  $\beta$ 2-адренергического рецептора проводили с помощью набора реагентов "SNP-экспресс-shot"-РВ НПФ "Литех", Россия: разбавитель, реакционная смесь, Taq-полимераза. Объем амплификационной смеси - 25 мкл.

Полимеразную цепную реакцию проводили по следующей программе.

При использовании амплификатора "CFX 96" (BioRad, США) выдерживали пробирки при +94°C - 3 мин, затем 40 циклов: при 94°C - 15 с, при 64°C - 40 с. При этом использовались каналы FAM и HEX. Детекция продуктов амплификации осуществлялась на каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа построила кривые накопления флуоресцентного сигнала: по каналу FAM - для аллели Gly, по каналу HEX - для аллели Arg.

Генотипирование полиморфизма C3872T гена С-реактивного белка проводили с помощью набора реагентов "SNP-экспресс" НПФ "Литех", Россия: разбавитель, реакционная смесь, Taq-полимераза. Объем амплификационной смеси - 25 мкл.

Реакцию амплификации проводили по следующей программе.

При использовании термоциклера T 100 Thermal Cycler (BioRad, США) выдерживали пробирки при +93°C - 1 мин, затем 35 циклов: при 93°C - 10 с, при 64°C - 10 с, при 72°C - 20с, а в конце при 72°C - 1 мин. После проведения амплификации осуществляли анализ продуктов реакции в 3% агарозном геле с окраской бромистым этидием и визуализацией в проходящем УФ-свете.

При анализе результатов проведенного исследования были выявлены генотип Gly/Gly гена  $\beta$ 2-адренергического рецептора и генотип CC гена С-реактивного белка.

Вывод: генотип Gly/Gly гена  $\beta$ 2-адренергического рецептора свидетельствует об отсутствии генетически обусловленных нарушений функции  $\beta$ 2-адренорецепторов, генотип CC гена С-реактивного белка свидетельствует об отсутствии генетически детерминированной повышенной активности воспалительных процессов. Таким образом, у этой больной нет одновременного наличия генотипа Arg/Arg гена  $\beta$ 2-адренергического рецептора и генотипа TT гена С-реактивного белка, т.е. у больной Х. не выявляется генетическая предрасположенность к развитию синтропии бронхиальной астмы и метаболического синдрома при воздействии производственных факторов сенсibiliзирующего и раздражающего действия, что указывает на отсутствие у больной Х.-высокого риска развития синтропии бронхиальной астмы и метаболического синдрома при воздействии производственных факторов сенсibiliзирующего и раздражающего действия. В дальнейшем это подтверждено отсутствием у больной Х. синтропии профессиональной бронхиальной астмы и метаболического синдрома, а развитием профессиональной бронхиальной астмы без развития метаболического синдрома, при этом выявлена профессиональная бронхиальная астма средней степени тяжести, дыхательная недостаточность 1-2 степени, что подтверждает отсутствие тяжелого течения астмы. Отсутствие метаболического синдрома у больной Х. подтверждают нормальная масса тела и отсутствие нарушений углеводного и липидного обменов.

Таким образом, предложенный способ позволяет повысить достоверность прогнозирования риска развития синтропии бронхиальной астмы и метаболического синдрома при воздействии производственных факторов сенсibiliзирующего и раздражающего действия на начальном этапе развития заболевания в процессе предварительных или периодических медицинских осмотров в условиях дефицита времени большого количества работающих или поступающих на работу на аллергоопасные производства. Это позволит осуществить своевременное проведение профилактики и лечения работников аллергоопасных производств для предотвращения развития и/или прогрессирования патологического процесса при развитии синтропии профессиональной бронхиальной астмы и метаболического синдрома.

Использование предлагаемого способа в клинических, биохимических и молекулярно-генетических лабораториях в процессе обследования большого количества работающих или поступающих на работу на аллергоопасные производства в условиях дефицита времени при проведении предварительных или периодических медицинских осмотров позволит разрабатывать профилактические мероприятия по предупреждению развития и/или прогрессирования синтропии профессиональной бронхиальной астмы и метаболического синдрома с учетом индивидуальных особенностей организма.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ прогнозирования риска развития синтропии бронхиальной астмы и метаболического синдрома, включающий забор венозной крови, выделение ДНК, проведение полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами для выявления полиморфизма Arg16Gly гена  $\beta$ 2-адренергического рецептора и полиморфизма С3872Т гена С-реактивного белка, причем обнаружение одновременно генотипа Arg/Arg гена  $\beta$ 2-адренергического рецептора и генотипа ТТ гена С-реактивного белка указывает на высокий риск развития синтропии бронхиальной астмы и метаболического синдрома при воздействии производственных факторов сенсibiliзирующего и раздражающего действия.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2

---