

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **047706**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.08.28**

(21) Номер заявки  
**202391965**

(22) Дата подачи заявки  
**2023.07.21**

(51) Int. Cl. **G01N 33/58** (2006.01)  
**C12Q 1/6806** (2018.01)  
**C12Q 1/6827** (2018.01)  
**C12Q 1/686** (2018.01)  
**C12Q 1/6876** (2018.01)  
**C12Q 1/6883** (2018.01)  
**G16H 50/30** (2018.01)

---

(54) **СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РИСКА РАЗВИТИЯ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СВИНЦА И ЕГО СОЕДИНЕНИЙ**

---

(43) **2024.08.27**

(96) **2023000122 (RU) 2023.07.21**

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

(72) Изобретатель:  
**Кузьмина Людмила Павловна,  
Бухтияров Игорь Валентинович,  
Хотулева Анастасия Григорьевна,  
Коляскина Мария Михайловна,  
Безрукавникова Людмила  
Михайловна, Анохин Николай  
Николаевич, Анварул Нана**

**Анзоровна, Хохлова Ольга  
Владимировна (RU)**

(56) KIM Hyung-Ki et al.: A polymorphism in AGT and AGTR1 gene is associated with lead-related high blood pressure. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2015 Dec; 16(4): 712-9. Epub 2014 Jul 16, реферат, стр. 2, левая колонка, абзац 5, правая колонка, абзацы 3-4, стр. 3, левая колонка, абзацы 1-3  
EA-B1-041770

JIAO Jiandong et al.: Lead exposure increases blood pressure by increasing angiotensinogen expression. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.*, 2016; 51(5): 434-9, стр. 434, правая колонка, абзац 1, стр. 436, правая колонка, абзац 2, стр. 437, левая колонка, абзац 1

MAATTA Kirsi M. et al.: Genetic variant coding for iron regulatory protein HFE contributes to hypertension, the TAMRISK study. *Medicine*, 2015 Jan; 94(4): e464, реферат

MANI MS. et al.: Ecogenetics of lead toxicity and its influence on risk assessment. *Human & Experimental Toxicology*, 2019; 38(9): 1031-1059, стр. 1037, правая колонка, абзац 2, стр. 1042, левая колонка, абзац 3, правая колонка, абзац 1

(57) Изобретение относится к медицине и может быть использовано для прогнозирования риска развития артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений. Задачей настоящего изобретения является повышение достоверности прогнозирования риска развития артериальной гипертензии у лиц, подвергающихся воздействию свинца и его соединений, при проведении предварительных и периодических медицинских осмотров большого количества, работающих за короткие (сжатые) сроки времени. Указанная задача достигается тем, что в известном способе прогнозирования риска развития артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений, включающем забор венозной крови, выделение генетического материала, проведение полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами, дополнительно проводят определение полиморфного варианта C521T гена AGT и H63D гена HFE методом флуоресцентной детекции в режиме реального времени и при одновременном обнаружении неблагоприятной аллели T C521T гена AGT в сочетании с неблагоприятной аллелью G H63D гена HFE прогнозируют высокий риск развития артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений. Техническим результатом изобретения является повышение достоверности прогнозирования риска развития артериальной гипертензии у лиц, подвергающихся воздействию свинца и его соединений, с учетом их индивидуальной чувствительности к воздействию свинца и его соединений, для своевременного предупреждения ее развития путем рационального трудоустройства вне воздействия свинца и его соединений и формирования групп повышенного риска с целью проведения своевременной коррекции для повышения адаптационных способностей организма различными неспецифическими способами. Предлагаемый способ может быть использован в клинических, биохимических, молекулярно-генетических лабораториях, укомплектованных широко используемым оборудованием, выпускаемым отечественной или зарубежной промышленностью.

**047706 B1**

**047706 B1**

Изобретение относится к медицине и может быть использовано для прогнозирования риска развития артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений.

Известен способ прогнозирования риска развития артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений, включающий забор венозной крови, выделение ДНК, проведение полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами и на основании этого выявление полиморфных вариантов генов ангиотензиногена (AGT) (Hyung-Ki Kim, Hwayoung Lee, Jun-Tack Kwon, Hak-Jae Kim. A polymorphism in AGT and AGTR1 gene is associated with lead-related high blood pressure. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2015 Dec; 16(4):712-9. doi: 10.1177/1470320313516174).

Однако данный способ осуществляет прогнозирование риска развития артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений только на выявлении полиморфных вариантов генов ангиотензиногена (AGT), не учитывая индивидуальной чувствительности к воздействию свинца и его соединений, который оказывает гипертензивный эффект путем активации процессов повышения сосудистого тонуса, эндотелиальной дисфункции и воспаления. Это снижает степень достоверности прогнозирования риска развития артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений, например, при проведении диспансеризации или периодических медицинских осмотров большого количества работающих в ограниченный период времени.

Задачей настоящего изобретения является повышение достоверности прогнозирования риска развития артериальной гипертензии у лиц, подвергающихся воздействию свинца и его соединений, при проведении предварительных и периодических медицинских осмотров большого количества, работающих за короткие (сжатые) сроки времени.

Техническим результатом изобретения является повышение достоверности прогнозирования риска развития артериальной гипертензии у лиц, подвергающихся воздействию свинца и его соединений, с учетом их индивидуальной чувствительности к воздействию свинца и его соединений, для своевременного предупреждения ее развития путем рационального трудоустройства вне воздействия свинца и его соединений и формирования групп повышенного риска с целью проведения своевременной коррекции для повышения адаптационных способностей организма различными неспецифическими способами.

Указанная задача достигается тем, что в известном способе прогнозирования риска развития артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений, включающем забор венозной крови, выделение генетического материала, проведение полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами, дополнительно проводят определение полиморфного варианта C521T гена AGT и H63D гена HFE методом флуоресцентной детекции в режиме реального времени и при одновременном обнаружении неблагоприятной аллели T C521T гена AGT в сочетании с неблагоприятной аллелью G H63D гена HFE прогнозируют высокий риск развития артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений.

Предлагаемый способ основан на исследовании комплекса диагностических тестов, при этом наличие неблагоприятной аллели T C521T гена AGT (rs4762) в сочетании с неблагоприятной аллелью G H63D гена HFE (rs1799945) играет важную роль при выявлении наследственной предрасположенности к развитию артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений.

Ген AGT кодирует белок ангиотензиноген, сывороточный глобулин, вырабатываемый клетками печени, из которого под действием ренина образуется ангиотензин I. Однонуклеотидный полиморфизм C521T гена AGT (rs4762) приводит к замене цитозина на тимин в 521 положении, в итоге в белке происходит замена аминокислоты треонин на метионин, в результате чего в плазме повышается уровень ангиотензиногена. Уровень ангиотензиногена может контролировать активность ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, и ее чрезмерная активация приводит к повышению уровня ангиотензина, что в свою очередь приводит к повышению артериального давления.

Ген HFE расположен на хромосоме 6p21.3, его полиморфный вариант H63D гена HFE (rs1799945) приводит к образованию белка с измененной структурой, что влияет на метаболизм железа в организме, происходит повышенная абсорбция железа и других металлов, в том числе свинца. Повышение содержания свинца в крови приводит к изменению обменной способности кальция, увеличению центральной симпатической активности, повышению уровня катехоламинов в плазме, блокированию  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, активации протеинкиназы гладких мышц и повышению активности ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, что приводит к стойкому повышению артериального давления и развитию артериальной гипертензии.

При одновременном обнаружении неблагоприятной аллели T C521T гена AGT (rs4762) в сочетании с неблагоприятной аллелью G H63D гена HFE (rs1799945) прогнозируют высокий риск развития артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений.

Таким образом, предложена совокупность приемов, позволяющих повысить достоверность прогнозирования риска развития артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений; за счет комплексной оценки различных звеньев патогенеза артериальной гипертензии у большого количества работающих в условиях воздействия свинца и его соединений за короткие (сжатые) сроки при проведении предварительных и периодических медицинских осмотров.

Проведенные исследования по патентным и научно-техническим информационным источникам по-

казали, что предлагаемый способ неизвестен и не следует явным образом из изученного уровня техники, т.е. соответствует критериям новизны и изобретательский уровень.

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

Следовательно, заявленный способ является доступным и практически применимым.

Предлагаемый способ осуществляют следующим образом.

У пациента осуществляют забор венозной крови.

Далее из 100 мкл цельной крови выделяют ДНК с использованием, например, комплекта реагентов для экстракции ДНК СИНТОЛ "S-Сорб" из клинического материала в соответствии с инструкцией к используемому комплекту.

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

Выявление полиморфизма C521T гена AGT (rs4762) и полиморфизма H63D гена HFE (rs1799945) проводят с помощью тест-системы для определения полиморфизмов генов, методом ПЦР "в режиме реального времени" с флуоресцентной детекцией накопления продуктов амплификации с помощью наборов, например, производства "Синтол", Россия - "SNP-Скрин". Объем амплификационной смеси - 25 мкл. Полимеразную цепную реакцию проводят по следующей программе: при использовании амплификатора "CFX 96" (BioRad, США) выдерживают пробирки при +95°C - 3 мин, затем 40 циклов при 95°C - 15 с, при 63°C - 40 с. При этом используют каналы FAM и HEX. Детекцию продуктов амплификации осуществляют на каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналу FAM и HEX.

При одновременном обнаружении неблагоприятной аллели T C521T гена AGT (rs4762) в сочетании с неблагоприятной аллелью G H63D гена HFE (rs1799945) прогнозируют высокий риск развития артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений.

Пример 1.

Пациент А., 47 лет. Профессия - плавильщик на заводе по производству вторичного свинца. Стаж - 6 лет. Работа заключается в ведении процесса плавления и восстановления свинцовых сплавов из свинцовых отходов в плавильно-восстановительной печи. Ежегодно проводились периодические медицинские осмотры, гипертоническая болезнь II ст., 2 ст., риск 3 с повышением АД до 150/100 мм рт.ст. диагностирована после 5 лет работы в условиях воздействия свинца.

Кровь больного исследовалась предлагаемым способом: из 100 мкл цельной крови выделяли ДНК с использованием комплекта реагентов для экстракции ДНК СИНТОЛ "S-Сорб" (Россия) в соответствии с инструкцией к используемому комплекту.

Из полученного препарата ДНК (объемом 50 мкл) готовили серии разведений в элюирующем растворе до конечной концентрации (1÷3) нг/мкл. Данный раствор ДНК использовали для постановки полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами.

Выявление полиморфизма C521T гена AGT (rs4762) проводили с помощью тест системы для определения полиморфизмов генов, методом ПЦР "в режиме реального времени" с флуоресцентной детекцией накопления продуктов амплификации с помощью наборов производства "Синтол", Россия - "SNP-Скрин". Объем амплификационной смеси - 25 мкл. Полимеразную цепную реакцию проводили по следующей программе: при использовании амплификатора "CFX 96" (BioRad, США) выдерживали пробирки при +95°C - 3 мин, затем 40 циклов: при 95°C - 15 с, при 63°C - 40 с. При этом использовали каналы FAM и HEX. Детекция продуктов амплификации осуществлялась на каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строила кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналу FAM для аллели C C521T гена AGT и по каналу HEX для аллели T.

Выявление полиморфизма H63D гена HFE (rs1799945) проводили с помощью тест-системы для определения полиморфизмов генов, методом ПЦР "в режиме реального времени" с флуоресцентной детекцией накопления продуктов амплификации с помощью наборов производства "Синтол", Россия - "SNP-Скрин". Объем амплификационной смеси - 25 мкл. Полимеразную цепную реакцию проводили по следующей программе: при использовании амплификатора "CFX 96" (BioRad, США) выдерживали пробирки при +95°C - 3 мин, затем 40 циклов при 95°C - 15 с, при 63°C - 40 с. При этом использовали каналы FAM и HEX. Детекцию продуктов амплификации осуществляют на каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строила кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналу FAM для аллели C и по каналу HEX для аллели G.

При анализе результатов были выявлены полиморфный вариант C521T гена AGT (rs4762) - C/T и полиморфный вариант H63D гена HFE (rs1799945) - G/G, что свидетельствует о нарушении экспрессии соответствующих генов, следствием чего явилось развитие артериальной гипертензии.

Вывод: у пациента А. выявлены неблагоприятная аллель T гена AGT и неблагоприятная аллель G гена HFE, следствием чего явилось развитие артериальной гипертензии через 5 лет работы в условиях

воздействия свинца и его соединений.

Пример 2.

Пациент С, 49 лет. Профессия - плавильщик на заводе по производству вторичного свинца. Стаж - 11 лет. Работа заключается в ведении процесса плавления и восстановления свинцовых сплавов из свинцовых отходов в плавильно-восстановительной печи. Ежегодно проводились периодические медицинские осмотры, гипертоническая болезнь не диагностирована после 11 лет работы в условиях воздействия свинца и его соединений.

Кровь больного исследовалась предлагаемым способом: из 100 мкл цельной крови выделяли ДНК с использованием комплекта реагентов для экстракции ДНК СИНТОЛ "S-Сорб" (Россия) в соответствии с инструкцией к используемому комплекту.

Из полученного препарата ДНК (объемом 50 мкл) готовили серии разведений в элюирующем растворе до конечной концентрации (1÷3) нг/мкл. Данный раствор ДНК использовали для постановки полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами.

Выявление полиморфизма C521T гена AGT (rs4762) проводили с помощью тест-системы для определения полиморфизмов генов методом ПЦР "в режиме реального времени" с флуоресцентной детекцией накопления продуктов амплификации с помощью наборов производства "Синтол", Россия - "SNP-Скрин". Объем амплификационной смеси - 25 мкл. Полимеразную цепную реакцию проводили по следующей программе: при использовании амплификатора "CFX 96" (BioRad, США) выдерживали пробирки при +95°C - 3 мин, затем 40 циклов при 95°C - 15 с, при 63°C - 40 с. При этом использовали каналы FAM и HEX. Детекция продуктов амплификации осуществлялась на каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строила кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналу FAM для аллели С C521T гена AGT и по каналу HEX для аллели Т.

Выявление полиморфизма H63D гена HFE (rs179945) проводили с помощью тест-системы для определения полиморфизмов генов методом ПЦР "в режиме реального времени" с флуоресцентной детекцией накопления продуктов амплификации с помощью наборов производства "Синтол", Россия - "SNP-Скрин". Объем амплификационной смеси - 25 мкл. Полимеразную цепную реакцию проводили по следующей программе: при использовании амплификатора "CFX 96" (BioRad, США) выдерживали пробирки при +95°C - 3 мин, затем 40 циклов при 95°C - 15 с, при 63°C - 40 с. При этом использовали каналы FAM и HEX. Детекцию продуктов амплификации осуществляют на каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строила кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналу FAM для аллели С C521T гена AGT и по каналу HEX для аллели G H63D гена HFE.

При анализе результатов были выявлены полиморфный вариант H63D гена HFE (rs179945) - C/C и полиморфный вариант C521T гена AGT (rs4762) - C/C, соответствующие норме, что свидетельствует о нормальном уровне экспрессии соответствующих генов, следствием чего явилось отсутствие артериальной гипертонии.

Вывод: у пациента С. выявлены аллель С гена AGT и аллель С гена HFE, соответствующие норме, следствием чего явилось отсутствие артериальной гипертонии через 11 лет работы в условиях воздействия свинца и его соединений.

Таким образом, предлагаемый способ позволяет повысить достоверность прогнозирования риска развития артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений в процессе проведения предварительных и периодических медицинских осмотров большого количества работающих за короткие (сжатые) сроки, для предупреждения развития артериальной гипертензии у работающих с генетической предрасположенностью к её развитию и, следовательно, имеющих повышенный риск развития артериальной гипертензии.

Предлагаемый способ может быть использован в клинических, биохимических, молекулярно-генетических лабораториях, укомплектованных широко используемым оборудованием, выпускаемым отечественной или зарубежной промышленностью.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ прогнозирования риска развития артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений, включающий забор венозной крови, выделение генетического материала, проведение полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами, отличающийся тем, что дополнительно проводят определение полиморфного варианта C521T гена AGT и H63D гена HFE методом флуоресцентной детекции в режиме реального времени и при одновременном обнаружении неблагоприятной аллели Т C521T гена AGT в сочетании с неблагоприятной аллелью G H63D гена HFE прогнозируют высокий риск развития артериальной гипертензии при воздействии свинца и его соединений.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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