

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2794991

Способ прогнозирования развития детского ожирения в Республике Башкортостан

Патентообладатели: *федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Башкирский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU), Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук (RU)*

Авторы: *Кочетова Ольга Владимировна (RU), Шангареева Зилия Асгатовна (RU), Корытина Гульназ Фаритовна (RU)*

Заявка № 2022115163

Приоритет изобретения **06 июня 2022 г.**

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации **27 апреля 2023 г.**

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает **06 июня 2042 г.**

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ
Сертификат 68b80077e14e40f0a94edbd24145d5c7
Владелец **Зубов Юрий Сергеевич**
Действителен с 2.03.2022 по 26.05.2023

Ю.С. Зубов





ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК
G01N 33/50 (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)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/50 (2023.02); C12Q 1/6806 (2023.02); C12Q 1/6827 (2023.02); C12Q 1/686 (2023.02); C12Q 1/6876 (2023.02); C12Q 1/6883 (2023.02)

(21)(22) Заявка: 2022115163, 06.06.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
06.06.2022

Дата регистрации:
27.04.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 06.06.2022

(45) Опубликовано: 27.04.2023 Бюл. № 12

Адрес для переписки:

450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3,
БАШГОСМЕДУНИВЕРСИТЕТ,
ПАТЕНТНЫЙ ОТДЕЛ, Самородов
Александр Владимирович

(72) Автор(ы):

Кочетова Ольга Владимировна (RU),
Шангареева Зилия Асгатовна (RU),
Корытина Гульназ Фаритовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Башкирский государственный
медицинский университет" Министерства
здравоохранения Российской Федерации
(RU),

Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение Уфимский федеральный
исследовательский центр Российской
академии наук (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2696446 C1, 01.08.2019. CN
106834501 A, 13.06.2017. BAUER L.O. et al.
GABRA2 Genotype, Impulsivity, and Body Mass.
Am J Addict. 2012; 21(5): 404-410. ZHAO J. et al.
Combined effects of AKT serine/threonine kinase
1 polymorphisms and environment on congenital
heart disease risk: a case-control study. Medicine.
2020; 99: 26(e20400).

(54) Способ прогнозирования развития детского ожирения в Республике Башкортостан

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к педиатрии, и может быть использовано для прогнозирования развития ожирения у детей, проживающих в Республике Башкортостан. Из лимфоцитов периферической венозной крови выделяют ДНК. Проводят амплификацию локуса rs3803300 гена протеинкиназы 1 АКТ1 и локуса rs279845 гена рецептора гамма-аминомасляной

кислоты GABRA2. При выявлении генотипов AG или AA полиморфного локуса rs3803300 гена АКТ1 и генотипов AT или AA полиморфного локуса rs279845 гена GABRA2 прогнозируют риск развития ожирения у ребенка. Способ обеспечивает повышение точности прогноза за счет выявления факторов предрасположенности к развитию заболевания. 2 табл., 5 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G01N 33/50 (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)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G01N 33/50 (2023.02); *C12Q 1/6806* (2023.02); *C12Q 1/6827* (2023.02); *C12Q 1/686* (2023.02); *C12Q 1/6876* (2023.02); *C12Q 1/6883* (2023.02)

(21)(22) Application: **2022115163, 06.06.2022**(24) Effective date for property rights:
06.06.2022Registration date:
27.04.2023

Priority:

(22) Date of filing: **06.06.2022**(45) Date of publication: **27.04.2023** Bull. № 12

Mail address:

450008, g. Ufa, ul. Lenina, 3,
**BASHGOSMEDUNIVERSITET, PATENTNYJ
OTDEL, Samorodov Aleksandr Vladimirovich**

(72) Inventor(s):

**Kochetova Olga Vladimirovna (RU),
Shangareeva Ziliia Asgatovna (RU),
Korytina Gulnaz Faritovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe biudzhethnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniia «Bashkirskii gosudarstvennyi
meditsinskii universitet» Ministerstva
zdravookhraneniia Rossiiskoi Federatsii (RU),
Institut biokhimii i genetiki -obosoblennoe
strukturnoe podrazdelenie Ufimskogo
federalnogo issledovatel'skogo tsentra Rossiiskoi
akademii nauk (RU)**

(54) **METHOD FOR PREDICTING THE DEVELOPMENT OF CHILDHOOD OBESITY IN THE REPUBLIC OF BASHKORTOSTAN**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; pediatrics.

SUBSTANCE: invention can be used to predict the development of obesity in children living in the Republic of Bashkortostan. DNA is isolated from peripheral venous blood lymphocytes. Amplification of the rs3803300 locus of the AKT1 protein kinase 1 gene and the rs279845 locus of the GABRA2 gamma-aminobutyric acid receptor gene is carried out. When AG or AA genotypes of the rs3803300 polymorphic

locus of the AKT1 gene and AT or AA genotypes of the rs279845 polymorphic locus of the GABRA2 gene are detected, the risk of developing obesity in a child is predicted.

EFFECT: method provides an increase in the accuracy of the prediction by identifying factors predisposing to the development of the disease.

1 cl, 2 tbl, 5 ex

C 1
1 6 9 4 9 1
R U

R U
2 7 9 4 9 9 1
C 1

Предлагаемое изобретение относится к медицине, а именно к педиатрии, и может быть использовано для прогнозирования развития ожирения в детском возрасте в Республике Башкортостан.

В настоящее время наблюдается рост детского ожирения во всем мире и в России [Бочарова О.В., Теплякова Е.Д. Ожирение у детей и подростков - проблема здравоохранения XXI века. Казанский мед. ж. 2020. Том 101, №3. С. 381-388]. К причинам детского ожирения относят нарушение пищевого поведения, заболевания, прием лекарственных средств, гиподинамия, наследственная предрасположенность. Наличие детского ожирения обуславливает риск метаболического синдрома, сахарного диабета 2, инсулинорезистентности [Петеркова В.А., Васюкова О.В. К вопросу о новой классификации ожирения у детей и подростков // Проблемы эндокринологии. 2015. Том 61, №2. С. 39-44]. По данным ВОЗ 50% детей с избыточным весом в детском возрасте страдают ожирением во взрослом, а в подростковом - эта вероятность увеличивается до 80% [Саидова Л.Б., Бадритдинова М.Н., Раупов А.А. Эпидемиология и состояние выявляемости ряда экстрагенитальных заболеваний, метаболического синдрома среди женщин фертильного возраста (обзор литературы) // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. 2018. №6. С. 131-141].

Известен способ оценки индивидуального риска формирования избыточной массы тела и ожирения у детей, потребляющих питьевую воду с повышенным содержанием хлороформа и тетрахлорметана, характеризующийся тем, что осуществляют отбор пробы крови, определение в ней концентрации хлороформа и тетрахлорметана, определение уровней общего холестерина и липопротеида низкой плотности (ЛПНП). Проводят анамнестическое обследование ребенка по трехбалльной шкале и генотипирование. Риск формирования у ребенка избыточной массы тела прогнозируют в случае повышения уровня общего холестерина выше 3,9 ммоль/л и уровня ЛПНП выше 1,8 ммоль/л, наличия у ребенка 6 и более баллов при анамнестическом обследовании, наличия гетерозиготного генотипа гена HTR2A rs7997012, повышения концентрации тетрахлорметана в крови выше референтной и концентрации хлороформа в пределах 5,17-5,59 мкг/л. Риск формирования ожирения прогнозируют при концентрации хлороформа равной или более 5,79 мкг/л [Патент RU 2619872, 2017]. Недостатком способа является то, что он может быть использован только в группе детей, употребляющих воду с повышенным содержанием хлороформа и тетрахлорметана.

Наиболее близким аналогом изобретения является способ прогнозирования риска развития ожирения в детском возрасте, заключающийся в том, что проводят определение факторов риска и расчет по формуле. Из анамнеза выявляют такие факторы риска как отягощенная наследственность по артериальной гипертензии, отягощенная наследственность по ожирению, отягощенная наследственность по обменным нарушениям - ожирение и сахарный диабет у лиц I, II степени родства, патологическое течение беременности - преэклампсия, неполная семья, низкая физическая активность, носительство изоформы E4 гена APOE, носительство G-аллеля гена PPARG. Выясняют длительность исключительно грудного вскармливания. Риск развития ожирения определяют по формуле [Патент RU №2696446, 2019]. Недостатками метода являются трудоемкость ввиду сбора множественной информации об обследуемом лице, а также невысокая точность, поскольку не всегда возможно оценить наследственную отягощенность по всем перечисленным признакам.

Задачей изобретения стала разработка объективного, высокоинформативного способа прогнозирования развития ожирения в детском возрасте, позволяющего в

количественном отношении оценить риск возникновения данного заболевания у детей, проживающих в Республике Башкортостан.

Технический результат при использовании изобретения - повышение точности прогноза.

5 Самым эффективным в предотвращении взрывного роста детского ожирения являются профилактические мероприятия. Под первичной профилактикой подразумевается выявление групп повышенного риска по ожирению среди детей с использованием данных о молекулярно-генетических биомаркерах чувствительности. Применение на практике разработанного способа обеспечит выявление детей с высоким
10 риском развития ожирения.

Предлагаемый способ прогнозирования риска развития детского ожирения в Республике Башкортостан осуществляется следующим образом.

ДНК выделяют из лимфоцитов периферической крови. В качестве консерванта используют раствор следующего состава: 0,48% лимонной кислоты, 1,32% цитрата
15 натрия, 1,47%) глюкозы. При заборе крови к 1 мл консерванта добавляют 6 мл крови и хорошо перемешивают.

Для получения ДНК необходимой степени чистоты и достаточного молекулярного веса используется метод выделения ДНК из крови фенольно-хлороформной экстракцией, описанный Мэтью (Mathew С.С. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA //
20 Methods in Molecular Biology / Ed. Walker J.M., N.Y., L.: Human Press. - 1984. - V. 2. -P. 31-34).

1. Кровь в пробирке с консервантом тщательно перемешивается и переливается в центрифужный стакан на 100 мл, туда же добавляют 50 мл охлажденного лизирующего буфера, содержащего 320 мМ сахарозы, 1% раствор тритона X-100, 5 мМ MgCl₂, 10мМ
25 трисНСl (рН 7,6).

2. Смесь центрифугируют 20 мин. при 4000 об./мин.

3. Надосадочную жидкость сливают, к получившемуся осадку приливают 8 мл 25 мМ ЭДТА, рН 8,0, суспензируют.

4. К суспензии добавляют 0,8 мл 10% SDS и протеиназу К (концентрация - 10 мг/мл).

30 Смесь для лизиса оставляют на ночь в термостате при температуре 38°C.

Экстракцию ДНК осуществляют в следующем порядке.

1. Для депротенизации к лизату добавляют 0,5 мл 5М перхлората натрия и 8 мл фенола, насыщенного 1М трисНСl до рН 7,8.

2. Смесь центрифугируют при 3000 об./мин. в течение 10 мин.

35 3. Отбирают водную фазу, содержащую ДНК, РНК и неденатурированные белки.

4. Отобранную фазу обрабатывают смесью фенол-хлороформа (1:1), а затем - хлороформом.

5. Препараты осаждают двумя объемами 96% этанола.

40 6. Образовавшийся осадок ДНК растворяют в 1,5 мл деионизированной Н₂О; раствор хранят при -20°C.

В дальнейшем полученную ДНК используют в качестве матрицы для полимеразной цепной реакции (ПЦР) для амплификации локуса rs3803300 гена протеинкиназы 1 АКТ1 и локуса rs279845 гена рецептора гамма-аминомасляной кислоты GABRA2.

45 Специфические последовательности олигонуклеотидных праймеров и условия ПЦР-анализа полиморфных локусов подбирались с помощью пакета программ DNA Star 5.05 и баз данных <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>.

Состав реакционной смеси для ПЦР был следующим: 0.1-1 мкг геномной ДНК, 0.5 мкМ каждого олигопраймера, 250 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата (Promega,

USA) помещали в 10 мкл однократного буфера для ПЦР следующего состава: 60 mM Tris-HCl, pH 8.5 при 25°C, 1.5 mM MgCl₂, 25 mM KCl; 10 mM 2-меркаптоэтанол; 0.1% Тритон X-100. Далее добавляют 5 единиц Taq- ДНК-полимеразы, 20-30 мкл минерального масла. Режим амплификации: 30 циклов со следующими параметрами: 94°C - 5 мин, 95°C - 30 секунд, 60°C -30 секунд, 72°C - 30 секунд. После 30-го цикла проводили инкубацию при 72°C в течение 5 минут.

Нуклеотидные замены в положении в промоторном регионе гена АКТ1 и интронный полиморфный маркер гена GABRA2, выявляют при помощи ПЦР-ПДРФ анализа. Для этого 7 мкл амплификата смешивают с 5 ед. соответствующих эндонуклеаз рестрикции, смесь выдерживают при 37°C в течение 10-12 часов в термостате для рестриктаз Alw26 I и Hinf I. Затем проводят электрофорез в вертикальном 7% полиакриламидном геле. В качестве электролита для электрофореза применяют 1X боратный буфер (0.089 M трис HCl pH=7.8; 0.089 M борная кислота, 0.002 M ЭДТА с pH=8.0). Данные о размерах получаемых фрагментов представлены в таблице 1.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с применением программного обеспечения MS Office Excel. При попарном сравнении частот аллелей и генотипов в группах больных и контроля применялся критерий χ^2 для таблиц сопряженности 2x2 с поправкой Йейтса на непрерывность [<http://www.biometrica.tomsk.ru/>]. При обнаружении статистически значимых различий (p<0,05) между исследуемыми выборками проводилась оценка показателя отношения шансов (odds ratio, OR), а также границ его 95%-ого доверительного интервала (CI 95%). Наблюдаемое распределение частот аллелей и генотипов по всем исследованным локусам соответствует ожидаемым из уравнения Харди-Вайнберга.

При выявлении генотипов AG или AA полиморфного локуса rs3803300 гена АКТ1 и генотипов AT или AA полиморфного локуса rs279845 гена GABRA2 прогнозируют риск развития ожирения у ребенка.

Нами были исследованы образцы ДНК у 263 ребенок с ожирением и 409 детей без ожирения. Средний возраст испытуемых с ожирением составил 6.5 лет, детей в контрольной группе 7.2 лет.

Исследование полиморфных вариантов rs3803300 гена АКТ1 и rs279845 гена GABRA2 среди детей с ожирением выявило следующие результаты (табл. 2). В группе детей с ожирением статистически значимо повышена частота генотипов AG-AA rs3803300 гена АКТ1 и частота генотипов AT-AA полиморфного локуса rs279845 гена GABRA2. Повышенный риск детского ожирения ассоциирован с вариантами AG-AA локуса rs3803300 гена АКТ1 и AT-AA локуса rs279845 гена GABRA2.

Для количественной оценки относительного риска развития заболевания для каждого из вышеуказанных генетических маркеров мы вычислили показатель соотношения шансов (oddsratio - OR). Для этого мы использовали формулу, предложенную Бландом [Bland, J.M. The odds ratio / J.M. Bland, D.G. Altaiian // Br. Med. J. - 2000. - Vol.320. - P. 1468]: $OR=(a \times d)/(b \times c)$, где a - число лиц с наличием, b - с отсутствием маркера (аллеля или генотипа) среди больных; c и d - число лиц соответственно с наличием и отсутствием маркера среди здоровых. Повышенный риск развития детского ожирения диагностируются при OR более 1.0.

Приводим пример конкретного расчета. В группе детей с ожирением идентифицировано 53 ребенка с генотипами риска AG-AA по полиморфному локусу rs3803300 гена АКТ1, т.е. a=53. У 210 детей с ожирением генотипы риска не идентифицированы, поэтому b=210. В контрольной группе выявлено 55 испытуемых с генотипами AG-AA, следовательно, c=55. В контрольной группе варианты риска

отсутствуют у 354 детей, это значит, что $d=354$. Подставив эти значения в вышеприведенную формулу, получим:

$OR=(53 \times 354)/(210 \times 55)=18762/11550=1.62$. Следовательно, у лиц, имеющих варианты гомозигот по редкому аллелю и гетерозигот AG-AA, риск развития детского ожирения повышен в 1.62 раз по сравнению с контролем. Вычисленные по результатам исследования показатели OR в дальнейшем используются в ходе разработки генетического паспорта пациента. Полученные в нашем исследовании показатели OR при наличии рискованных генотипов по локусам AKT1 rs3803300 и GABRA2 rs279845 представлены в таблице 2.

Изобретение иллюстрируется следующими клиническими примерами.

Пример 1.

Пациент Р., 16 лет, страдает ожирением с 10 лет. В семье было выявлено наличие факторов риска: мама страдает ожирением III степени. У ребенка было произведен забор биологического материала 4 мл крови. Результаты проведенного молекулярно-генетического анализа с последующим выделением ДНК методом фенольно-хлороформной экстракции и амплификацией фрагментов генов AKT1 rs3803300, GABRA2 rs279845 в реакционной смеси, содержащей 0.1-1 мкг геномной ДНК, 1 ед. Taq-полимеразы, 0.25 мкМ каждого олигопраймера, 250 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата в 25 мкл однократного буфера для ПЦР. После амплификации провели рестрикцию, а далее электрофорез фрагментов при постоянном напряжении 250-300 вольт после 15-минутного преэлектрофореза. После окончания электрофореза гель окрасили раствором бромистого этидия в течение 10 минут и анализировали при ультрафиолетовом освещении на трансиллюминаторе. При исследовании полиморфного локуса AKT1 rs3803300 был выявлен генотип AA, при котором показатель соотношения шансов развития ожирения составляет 3.37 (табл. 2). По локусу GABRA2 rs279845 также был выявлен генотип риска AA в этом случае вероятность развития ожирения повышается в 0.81 (табл. 2).

Родителям пациента были предложены мероприятия по коррекции веса ребенка, медикаментозные препараты, увеличение двигательной активности. Данные рекомендации не были выполнены в полном объеме, при обследовании через два года у ребенка был диагностирован сахарный диабет 2 типа, вес продолжал увеличиваться.

Пример 2.

Мама пациентки У. больна метаболическим синдромом и ожирением в течение последних двух лет. Обратилась по вопросу генетического консультирования дочери 6 лет, также страдающей ожирением с рождения. Для проведения генетического тестирования было взято 4 мл крови у мамы и дочери. Выделение ДНК было осуществлено с помощью метода фенольно-хлороформной экстракции с последующим проведением ПЦР-ПДРФ анализа локусов AKT1 rs3803300, GABRA2 rs279845

У дочери было взято 4 мл венозной крови с последующим выделением ДНК методом фенольно-хлороформной экстракции и амплификацией фрагментов генов AKT1 rs3803300, GABRA2 rs279845 в реакционной смеси, содержащей 0,1-1 мкг геномной ДНК, 1 ед. Taq-полимеразы, 0,25 мкМ каждого олигопраймера, 250 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата в 25 мкл однократного буфера для ПЦР для каждого локуса. Было осуществлено расщепление полученных амплификатов маркеров rs3803300 гена AKT1 с добавлением фермента Alw26 I и rs279845 гена GABRA2.

После амплификации проводили электрофорез фрагментов генов AKT1 rs3803300, GABRA2 rs279845 при постоянном напряжении 250-300 вольт после 15-минутного преэлектрофореза. После окончания электрофореза гель окрасили раствором

бромистого этидия в течение 10 минут и анализировали при ультрафиолетовом освещении на трансиллюминаторе.

При исследовании полиморфного локуса АКТ1 rs3803300 был выявлен генотип АА при котором показатель соотношения шансов развития ожирения составляет 3.37 и генотип АТ rs279845 гена GABRA2, в этом случае риск составляет 0.66 (табл. 2).

Учитывая высокий генетический риск ожирения у ребенка, родителям были предложены превентивные мероприятия по коррекции веса ребенка изменение образа жизни, диетотерапию, расширение физической активности. Данные рекомендации не были выполнены в полном объеме, дочь пациентки продолжила набирать вес.

Пример 3.

Пациент Н., 14 лет, страдает ожирением с 8 лет. В семье было выявлено наличие факторов риска: мама страдает ожирением III степени. У папы ребенка ожирение II степени и артериальная гипертензия. На консультации у эндокринолога родителям ребенка было предложено проведение молекулярно-генетического исследования для определения риска развития детского ожирения. У пациента был произведен забор биологического материала 4 мл крови. Результаты проведенного молекулярно-генетического анализа с последующим выделением ДНК методом фенольно-хлороформной экстракции и амплификацией фрагментов генов АКТ1 rs3803300, GABRA2 rs279845 в реакционной смеси, содержащей 0.1-1 мкг геномной ДНК, 1 ед. Таq-полимеразы, 0.25 мкМ каждого олигопраймера, 250 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата в 25 мкл однократного буфера для ПЦР. После амплификации провели рестрикцию, а далее электрофорез фрагментов при постоянном напряжении 250- 300 вольт после 15-минутного преэлектрофореза. После окончания электрофореза гель окрасили раствором бромистого этидия в течение 10 минут и анализировали при ультрафиолетовом освещении на трансиллюминаторе. При исследовании полиморфного локуса АКТ1 rs3803300 был выявлен генотип АГ при котором показатель соотношения шансов развития ожирения составляет 1.56 и генотип АА rs279845 гена GABRA2, в этом случае риск составляет 0.81 (табл. 2).

Родителям пациента были предложены мероприятия по коррекции веса ребенка: диетотерапия, медикаментозные препараты, увеличение двигательной активности. Данные рекомендации не были выполнены в полном объеме, при обследовании через два года у ребенка была диагностирована артериальная гипертензия, ожирение сохранялось.

Пример 4.

Пациент Б., 8 лет, находился на лечении в стационаре по поводу обструктивного бронхита. Дополнительно было диагностировано эндогенно-конституциональное ожирение I степени. У мамы пациента выявлен метаболический синдромом и ожирением в течение последних десяти лет. Семье рекомендовали консультацию эндокринолога. Пациенту было предложено проведение молекулярно-генетического исследования для определения риска развития детского ожирения. Для проведения молекулярно-генетического анализа у пациента К. было взято 4 мл венозной крови с последующим выделением ДНК методом фенольно-хлороформной экстракции и амплификацией фрагментов генов АКТ1 rs3803300, GABRA2 rs279845 в реакционной смеси, содержащей 0,1-1 мкг геномной ДНК, 1 ед. Таq-полимеразы, 0,25 мкМ каждого олигопраймера, 250 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата в 25 мкл однократного буфера для ПЦР. После амплификации провели электрофорез фрагментов при постоянном напряжении 250- 300 вольт после 15-минутного преэлектрофореза. После окончания электрофореза гель окрасили раствором бромистого этидия в течение 10 минут и анализировали при

ультрафиолетовом освещении на трансиллюминаторе. При исследовании полиморфного локуса AKT1 rs3803300 был выявлен генотип AG при котором показатель соотношения шансов развития ожирения составляет 1.56 и генотип AT rs279845 гена GABRA2, в этом случае риск составляет 0.66 (табл. 2).

5 Родителям ребенка были предложены превентивные мероприятия по коррекции веса ребенка путем диетотерапии и расширения физической активности. Данные рекомендации не были выполнены в полном объеме, сын пациентка продолжил набирать вес, что было зафиксировано на повторной консультации у эндокринолога через год.

Пример 5.

10 Пациент К., 4 года, обратился к гастроэнтерологу по поводу болей в животе. Была диагностирована дискинезии желчевыводящих путей и ожирение I степени. Семье рекомендовали консультацию эндокринолога. Пациенту было предложено проведение молекулярно-генетического исследования для определения риска развития детского ожирения. Для проведения молекулярно-генетического анализа у пациента К. было
15 взято 4 мл венозной крови с последующим выделением ДНК методом фенольно-хлороформной экстракции и амплификацией фрагментов генов AKT1 rs3803300, GABRA2 rs279845 в реакционной смеси, содержащей 0,1-1 мкг геномной ДНК, 1 ед. Таq-полимеразы, 0,25 мкМ каждого олигопраймера, 250 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата в 25 мкл однократного буфера для ПЦР. После
20 амплификации провели электрофорез фрагментов при постоянном напряжении 250-300 вольт после 15-минутного преэлектрофореза. После окончания электрофореза гель окрасили раствором бромистого этидия в течение 10 минут и анализировали при ультрафиолетовом освещении на трансиллюминаторе. При исследовании полиморфного локуса AKT1 rs3803300 был выявлен генотип пониженного риска GG (показатель
25 соотношения шансов развития ожирения в этом случае составляет 0.61), а при исследовании полиморфного локуса GABRA2 rs279845 был выявлен протективный генотип TT (OR=1.60) (табл. 2).

Для данных вариантов прогноз развития ожирения в дальнейшем является благоприятным. В последующем родители к эндокринологу не обращались.

30 Приведенные примеры демонстрируют прогностическую и диагностическую значимость предлагаемого способа. Способ позволяет прогнозировать риск развития детского ожирения до его клинических проявлений и развития коморбидных состояний заболевания.

Таблица 1

35 **Данные о полиморфных вариантах генов, последовательности праймеров и размерах получаемых фрагментов**

Ген, полиморфизм	Последовательность праймеров (5'→3')	Метод детекции и температура отжига, °С	Рестриктаза Температура инкубации	Аллели
40 AKT1 rs3803300 5' регион	CTCCATCTGCCTCCAGAACC GCTGTGGCATCATTGTCACTC	ПЦР/ПДРФ 59	<i>Alw26 I</i> 37	A - 200, 250 пн. G- 450 пн.
45 GABRA2 rs279845 Инtron	TGCCATGTTTGTACAGGTT CCAAGTTTGTAGTAGGCATGA A	ПЦР/ПДРФ 57	<i>Hinf I</i> 37	T - 574 пн. A - 402 + 72 пн.

Анализ ассоциаций генотипов генов *AKT1* и *GABRA2* с риском развития СД2

Ген, ОНП	Тест/ модель	Контроль N=409	Ожирение N=263	OR (95% CI)	P-value
<i>AKT1</i> <i>rs3803300</i>	GG	354 (86.5%)	210 (79.8%)	0.61 (0.40-0.93)	0.04
	AG	53 (12.9%)	49 (18.6%)	1.56 (1.02-2.38)	
	AA	2 (0.6%)	4 (1.6%)	3.37 (0.61-18.57)	
	GG	354 (86.5%)	210 (79.8%)	0.61 (0.40-0.93)	0.022
	AG-AA	55 (13.5%)	53 (20.1%)	1.62 (1.07-2.46)	
<i>GABRA2</i> <i>rs279845</i>	TT	114 (27.9%)	107 (40.6%)	1.60 (1.15-2.22)	0.003
	AT	212 (51.8%)	111 (42.2%)	0.66 (0.48-0.90)	
	AA	83 (20.3%)	45 (17.2%)	0.81 (0.54-2.21)	
	TT	114 (27.9%)	107 (40.6%)	1.60 (1.15-2.22)	0.007
	AT-AA	265 (72.1%)	156 (62.4%)	0.62 (0.45-0.87)	

Примечание: * - различия между сравниваемыми группами статистически значимые при $P \leq 0.5$. P - уровень статистической значимости; жирным шрифтом выделены маркеры повышенного риска ожирения у детей.

(57) Формула изобретения

Способ прогнозирования развития ожирения у детей, проживающих в Республике Башкортостан, включающий выделение ДНК из лимфоцитов периферической венозной крови, генотипирование методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК, отличающийся тем, что проводят амплификацию локуса rs3803300 гена протеинкиназы 1 *AKT1* и локуса rs279845 гена рецептора гамма-аминомасляной кислоты *GABRA2* и при выявлении генотипов AG или AA полиморфного локуса rs3803300 гена *AKT1* и генотипов AT или AA полиморфного локуса rs279845 гена *GABRA2* прогнозируют риск развития ожирения у ребенка.