



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/582 (2021.02); C12Q 1/6876 (2021.02); G01N 2800/50 (2021.02)

(21)(22) Заявка: 2021103863, 16.02.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.02.2021Дата регистрации:
07.07.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 16.02.2021

(45) Опубликовано: 07.07.2021 Бюл. № 19

Адрес для переписки:

308015, Белгородская обл., г. Белгород, ул.
Победы, 85, НИУ "БелГУ", ОИС, Токтаревой
Т.М.

(72) Автор(ы):

Чурносов Михаил Иванович (RU),
Беляева Татьяна Михайловна (RU),
Елыкова Анна Владимировна (RU),
Пономаренко Ирина Васильевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет" (НИУ "БелГУ") (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2574015 C1, 27.01.2016. RU
2585382 C1, 27.05.2016. RU 2572338 C1,
10.01.2016. БЕЛЯЕВА Т.М. Изучение
ассоциаций гаплотипов полиморфизма гена
FLG с развитием хронической истинной
экземы у мужчин. Научные результаты
биомедицинских исследований. 2020; 6(2): 160-
171. ДЕНИСОВА Я.Е. и др. Ассоциация
полиморфизма лимфотоксина α (+250 A/G Lta)
с (см. прод.)

(54) Способ прогнозирования повышенного риска развития хронической истинной экземы у мужчин с использованием данных о полиморфизме гена филагтрина

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины. Предложен способ прогнозирования повышенного риска развития хронической истинной экземы у мужчин, родившихся и проживающих в Центральном Черноземье России, имеющих русскую национальность и не являющихся родственниками. Из периферической венозной крови выделяют ДНК. Проводят анализ полиморфизмов rs12130219, rs10888499, rs4363385 и rs12144049 гена FLG. Прогнозируют высокий риск развития хронической истинной экземы у

мужчин при комбинации генотипов rs12130219 AA x rs10888499 AC x rs4363385 CT x rs12144049 TC гена FLG. Изобретение обеспечивает получение критериев оценки риска развития хронической истинной экземы у мужчин, родившихся и проживающих в Центральном Черноземье России, имеющих русскую национальность и не являющихся родственниками, на основе данных о полиморфных локусах rs12130219, rs10888499, rs4363385 и rs12144049 гена FLG. 2 пр., 4 ил.

(56) (продолжение):

формированием хронической истинной экземы. *Современные проблемы науки и образования*. 2014; 3: 1-8.
BAURECHT H. et al. Genome-wide Comparative Analysis of Atopic Dermatitis and Psoriasis Gives Insight into Opposing Genetic Mechanisms. *Am J Hum Genet*. 2015 Jan 8; 96(1): 104-120. COCCHI E. et al. A model to investigate SNPs' interaction in GWAS studies. *Journal of Neural Transmission*. 2015; 122: 145-153.

R U 2 7 5 0 9 6 3 C 1

R U 2 7 5 0 9 6 3 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G01N 33/582 (2021.02); *C12Q 1/6876* (2021.02); *G01N 2800/50* (2021.02)(21)(22) Application: **2021103863, 16.02.2021**(24) Effective date for property rights:
16.02.2021Registration date:
07.07.2021

Priority:

(22) Date of filing: **16.02.2021**(45) Date of publication: **07.07.2021** Bull. № 19

Mail address:

**308015, Belgorodskaya obl., g. Belgorod, ul.
Pobedy, 85, NIU "BelGU", OIS, Toktarevoj T.M.**

(72) Inventor(s):

**Churnosov Mikhail Ivanovich (RU),
Belyaeva Tatyana Mikhailovna (RU),
Elykova Anna Vladimirovna (RU),
Ponomarenko Irina Vasilevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Belgorodskij gosudarstvennyj
natsionalnyj issledovatel'skij universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**(54) **METHOD FOR PREDICTING AN INCREASED RISK OF DEVELOPING CHRONIC TRUE ECZEMA IN MEN USING DATA ON FILAGGRIN GENE POLYMORPHISM**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to the field of medicine. A method for predicting the increased risk of developing chronic true eczema in men born and living in the Central Black Earth region of Russia, of Russian origin and not being relatives is proposed. DNA is isolated from peripheral venous blood. The FLG gene polymorphisms rs12130219, rs10888499, rs4363385 and rs12144049 are analyzed. A high risk of developing chronic true eczema is predicted in men with a

combination of genotypes rs12130219 AA x rs10888499 AC x rs4363385 CT x rs12144049 TC of the FLG gene.

EFFECT: invention provides criteria for assessing the risk of developing chronic true eczema in men born and living in the Central Chernozem region of Russia, of Russian nationality and are not relatives, based on data on polymorphic loci rs12130219, rs10888499, rs4363385 and rs12144049 of the FLG gene.

1 cl, 4 dwg, 2 ex

Экзема – острое или хроническое рецидивирующее аллергическое заболевание кожи, формирующееся под влиянием экзогенных и эндогенных триггерных факторов и характеризующееся появлением полиморфной сыпи, острой воспалительной реакцией, обусловленной серозным воспалением кожи, и сильным зудом (Федеральные клинические рекомендации, 2016).

Распространенность экземы среди населения мира составляет 10-20% (Zhu J., Wang Z., Chen F. Association of Key Genes and Pathways with Atopic Dermatitis by Bioinformatics Analysis // *Med Sci Monit.* 2019;25:4353–4361). При этом встречаемость экземы в странах Западной Европы выше, чем в странах Восточной Европы, Африки, Центральной Азии и Китае (Kim J.E., Kim J.S., Cho D.H., et al. Molecular Mechanisms of Cutaneous Inflammatory Disorder: Atopic Dermatitis // *Int J Mol Sci.* 2016;17(8):1234).

Согласно данным литературы, в США общие экономические затраты на лечение экземы составляют более 4,2 млрд. долларов в год (Margolis D.J., Mitra N., Gochbauer H., et al. Uncommon Filaggrin Variants Are Associated with Persistent Atopic Dermatitis in African Americans // *J Invest Dermatol.* 2018;138(7):1501–1506).

Экзема составляет 30-40% всех кожных заболеваний. По данным разных авторов, заболеваемость колеблется от 6,0 до 15,0 случаев на 1000 населения. Экзему регистрируют во всех странах и у представителей всех рас с одинаковой частотой у мужчин и женщин. Заболевание может возникнуть как в раннем детском возрасте, так и у лиц пожилого возраста. Пик заболеваемости отмечается в возрасте 40 лет [Оспанова С.А. Совершенствование терапии экземы с учетом эндогенной интоксикации: савтореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.11 /С.А. Оспанова; Казах. науч.-исслед. кож.-венерол. ин-т М-ва здравоохранения Респ. Казахстан. - Алматы, 2008. - 21 с.].

Экзема является мультифакториальной патологией со значимой ролью в ее формировании генетических факторов [Федеральные клинические рекомендации. Дерматовенерология 2015: Болезни кожи. Инфекции, передаваемые половым путем. 5-е изд., перераб. и доп. М.: Деловой экспресс; 2016].

Этиологический и патогенетический аспекты развития экземы, освещенные в современной литературе, носят противоречивый характер. На разных этапах развития учений об экземе важное значение в этиологии и патогенезе экземы придавали неврогенной и аллергической теориям, роли эндокринной системы, наследственным факторам. Следует отметить, что этиология и патогенез экземы чрезвычайно сложны и во многих своих аспектах остаются неизученными [Кошелева И.В. Эффективность комплексного лечения больных экземой при использовании различных методик озонотерапии/И.В. Кошелева, А.Г. Куликов //Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. - 2001. - №5. - С. 40-42].

Как свидетельствуют результаты ряда исследований [Chen G. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway /G. Chen, D. V. Goeddel //*Science.* - 2002. - Vol. 296, №5573. - P. 1634-1635] важную роль в развитии хронической истинной экземы (далее ХИЭ) играют генетические факторы. Изучение этиопатогенеза экземы с применением современных методов исследования выявило значимую роль таких процессов, как инвазия, пролиферация, апоптоз, воспаление в формировании истинной экземы. Важную роль в развитии, клинике и прогнозе заболевания играют факторы некроза опухолей и их рецепторы.

Важный вклад в формирование подверженности к развитию экземы вносят мутации в гене филаггрина (Marenholz I., Esparza-Gordillo J., Rüschenhoff F., et al. Meta-analysis identifies seven susceptibility loci involved in the atopic march // *Nat Commun.* 2015;6:8804). Различными научными коллективами активно изучаются ассоциации мутаций гена филаггрина, связанных с потерей функции (loss-of-function variants), с формированием

экземы.

Филаггрин – это многофункциональный, богатый гистидином, нерастворимый эпидермальный белок, синтезируемый в виде крупного предшественника (400 kDa) под названием профилаггрин и хранящийся в гранулах кератогиалина (Cau L., Pendaries V., Lhuillier E., et al. Lowering relative humidity level increases epidermal protein deimination and drives human filaggrin breakdown // *Dermatol Sci.* 2017;86(2):106–113.). Профилаггрин посттрансляционно расщепляется на отдельные филаггриновые пептиды, которые связываются с кератиновыми нитями и агрегируют в цитоскелете кератиноцитов, конденсируясь в плотные пучки (Pin D., Pendaries V., Keita Alassane S., et al. Refined Immunochemical Characterization in Healthy Dog Skin of the Epidermal Cornification Proteins, Filaggrin, and Corneodesmosin // *J Histochem Cytochem.* 2019;67(2):85–97.). Это способствует поддержанию сцепления и постоянства между корнеоцитами, которые образуют кожный барьер, тем самым предотвращая трансэпидермальную потерю воды и защищая от неблагоприятного воздействия внешних факторов, таких как патогенные микроорганизмы и аллергены (Goleva E., Berdyshev E., Leung D.Y. Epithelial barrier repair and prevention of allergy // *J Clin Invest.* 2019;129(4):1463-1474.). Кроме того, отдельные пептиды филаггрина далее разлагаются на свободные аминокислоты, которые, в свою очередь, расщепляются на урокановую и пирролидонкарбоновую кислоты, защищающие кожу от ультрафиолетового излучения и способствующие естественному ее увлажнению и поддерживающие рН градиента кожи (McAleer M.A., Jakasa I., Raj N., et al. Early-life regional and temporal variation in filaggrin-derived natural moisturizing factor, filaggrin-processing enzyme activity, corneocyte phenotypes and plasmin activity: implications for atopic dermatitis // *Br J Dermatol.* 2018;179(2):431–441).

Таким образом, филаггрин играет ключевую роль в формировании барьера кожи, он участвует в поддержании уровня гидратации в эпидермисе, регуляции рН кожи, антибактериальной защите и устойчивости кожи к ультрафиолетовому излучению (Margolis D.J., Mitra N., Gochbauer H., et al. Uncommon Filaggrin Variants Are Associated with Persistent Atopic Dermatitis in African Americans // *J Invest Dermatol.* 2018;138(7):1501–1506). Согласно литературным данным, недостаток филаггрина лежит в основе патогенеза различных кожных болезней (экзема, аллергический контактный дерматит, вульгарный ихтиоз), а также связан с формированием не кожных заболеваний (сахарный диабет, воспалительные заболевания желудочно-кишечного тракта) (Ziyab A.H., Ewart S., Lockett G.A., et al. Expression of the filaggrin gene in umbilical cord blood predicts eczema risk in infancy: A birth cohort study // *Clin Exp Allergy.* 2017;47(9):1185–1192).

На сегодняшний день идентифицировано около 60 мутаций в гене FLG, связанных с потерей функции филаггрина (loss-of-function variants). Установлено, что мутации, приводящие к потере функции или нулевые мутации гена филаггрина, обуславливают образование неактивной формы синтезированного полипептида (вследствие преждевременного прекращения синтеза, сигналом для которого являются появившиеся в результате мутаций стоп-кодона). Это в конечном итоге приводит к низкой концентрации профилаггрина в зернистом слое эпидермиса, что в последующем определяет формирование аномально тонкого слоя кератиноцитов, и является морфологическим субстратом, лежащим в основе предрасположенности к хроническим заболеваниям кожи (дерматит, экзема, псориаз и др.) (Сепелак I., Dodig S., Pavić I. Filaggrin and atopic march // *Biochem Med (Zagreb).* 2019;29(2):020501).

Частота мутаций гена FLG в общей популяции составляет 8-10%, причем существуют значительные межэтнические различия в их распространенности (Park K.D., Pak S.C., Park K.K. The Pathogenetic Effect of Natural and Bacterial Toxins on Atopic Dermatitis // *Toxins*

(Basel). 2016;9(1):3).

Согласно данным литературы, мутации в гене филаггрина связаны с развитием различных заболеваний кожи, таких как экзема, аллергический контактный дерматит, атопический дерматит, вульгарный ихтиоз, герпетическая экзема и др., а также являются факторами риска развития аллергического ринита, бронхиальной астмы, сахарного

5 диабета и др.

Мутации в гене FLG, связанные с потерей функции являются известными факторами риска развития экземы и встречаются у 10-50% больных (Leitch C.S., Natafji E., Yu C., et al. Filaggrin-null mutations are associated with increased maturation markers on Langerhans cells // J Allergy Clin Immunol. 2016;138(2):482-490.e7). Они снижают экспрессию филаггрина и способствуют возникновению функциональных дефектов эпидермального барьера (Wallmeyer L., Dietert K., Sochorová M., et al. TSLP is a direct trigger for T cell migration in filaggrin-deficient skin equivalents // Sci Rep. 2017;7(1):774). Имеются данные, что у больных экземой, имеющих мутации в гене FLG наблюдается более тяжелое течение заболевания и повышенная аллергическая сенсibilизация, чем у пациентов с экземой не имеющих

10 данных мутаций. Кроме того, следует отметить, что наличие мутаций в гене FLG у женщины увеличивает в 1,5 раза риск развития экземы у ее ребенка ($p=8,4 \times 10^{-8}$), даже если он и не унаследовал от матери данный генетический дефект (Esparza-Gordillo J., Matanovic A., Marenholz I., et al. Maternal filaggrin mutations increase the risk of atopic dermatitis in children: an effect independent of mutation inheritance // PLoS Genet. 2015;11(3):e1005076).

В Российской Федерации исследования вовлеченности гена филаггрина в формирование предрасположенности к хронической истинной экземе у мужчин и ее осложнений единичны и фрагментарны, а данные о роли генетических вариантов rs12130219, rs10888499, rs4363385 и rs12144049 FLG в развитии ХИЭ у мужчин

15 отсутствуют.

Для оценки сложившейся патентной ситуации был выполнен поиск по охраняемым документам за период с 1990 по 2020 гг. Анализ документов производился по направлению: способ прогнозирования риска развития хронической истинной экземы на основе молекулярно-генетических данных в зависимости от полиморфных маркеров

20 гена филаггрина. Источники информации: сайты Федерального института промышленной собственности <http://fips.ru>.

В изученной научно-медицинской и доступной патентной литературе авторами не было обнаружено способа прогнозирования риска развития ХИЭ у мужчин на основе данных о SNP x SNP взаимодействиях и комбинации генотипов, ассоциированных с

25 развитием ХИЭ у мужчин генетических полиморфизмов rs12130219, rs10888499, rs4363385 и rs12144049 гена FLG.

Известен способ прогнозирования риска раннего развития профессиональных аллергических дерматозов по патенту РФ №2467330 (опубл. 2012.11.20), включающий забор венозной крови, выделение генетического материала, проведение полимеразной

30 цепной реакции со специфическими праймерами, определение нуклеотидной последовательности и на основании этого определение полиморфного варианта A4889G цитохрома P-450 1A1, отличающийся тем, что при проведении полимеразной цепной реакции используют специфические праймеры C1A1-F Biotin - ggT gTT Aag TgA gAA ggT gAT T C1A1-R Cag gAT AgC Cag gAA gAg AAA, а после проведения

35 полимеразной цепной реакции проводят реакцию пиросеквенирования в режиме реального времени с использованием специфического праймера C1A1-S ACC TCC Cag Cgg gCA A и детекцию нуклеотидной последовательности с помощью хемилюминесцентного сигнала, далее проводят сравнение полученной нуклеотидной

последовательности в положении 4889 с референсными последовательностями, при выявлении на полученной программе отсутствия замены аденина на гуанин и при воздействии на организм вредного производственного фактора раздражающего и сенсibiliзирующего действия прогнозируют риск раннего развития профессиональных аллергических дерматозов менее 40%, при выявлении на полученной программе гетерозиготного варианта Cyp1A1*2C, обусловленного заменой аденина на гуанин в нуклеотидной последовательности в положении 4889, и при воздействии на организм вредного производственного фактора раздражающего и сенсibiliзирующего действия прогнозируют 40÷80% риска раннего развития профессиональных аллергических дерматозов. Недостатком патента является то, что не учитывается влияние на развитие ХИЭ других генетических полиморфизмов и их сочетаний, не учитывается половая специфичность.

Известен способ прогноза течения и оценки эффективности лечения атопического дерматита, который заключается в проведении клинического и лабораторного обследования пациентов с верифицированным атопическим дерматитом с определением содержания в сыворотке крови белка - лактоферрина (ЛФ) в мкг/мл, альфа-1-антитрипсина (α1-АТ) в г/л, альфа-2-макроглобулина (α2-МГ) в г/л, далее вычисляют коэффициент К по определенной формуле и при его значениях от 6 до 15 прогнозируют легкую степень тяжести заболевания, а при 15 и более - среднюю и тяжелую степень тяжести заболевания, через месяц после лечения проводят повторное обследование с вычислением коэффициента К и при его снижении на 30% и более от его исходного значения лечение считают эффективным, прогнозируют длительную ремиссию, а при снижении коэффициента К менее 30% от его исходного значения лечение считают малоэффективным, прогнозируют короткий период ремиссии и высокий риск рецидива [патент RU 2603463, 2016 г.]. Недостатками данного способа являются несвоевременность оценки эффективности лечения и трудоемкость, а также то, что не учитывается влияние на развитие ХИЭ других генетических полиморфизмов и их сочетаний, не учитывается половая специфичность.

Из уровня техники известен способ прогнозирования среднетяжелого течения хронической истинной экземы у индивидуумов русской национальности, уроженцев Центрального Черноземья РФ (Патент РФ №2578441). Сущность способа заключается в том, что выделяют ДНК из периферической венозной крови, проводят анализ полиморфизмов генов -308G/A TNFα,+250A/G Ltα,+1663A/G TNFR2 и их сочетаний. Повышенный риск развития среднетяжелого течения хронической истинной экземы прогнозируют при наличии аллеля +250G Ltα или сочетании аллеля+250G Ltα с аллелем +1663G TNFR2, или сочетании аллеля -308A TNFα с аллелем +1663G TNFR2, или сочетании аллеля -308G TNFα с аллелем+250G Ltα. Прогнозируют пониженный риск развития среднетяжелого течения ХИЭ при сочетании аллеля -308G TNFα с генотипом +250AA Ltα. Однако известный способ оценивает только генетический риск развития хронической истинной экземы, поскольку исследуются гены рецепторной системы фактора некроза опухоли, отражающие события апоптоза, но не учитывается влияние на развитие ХИЭ других генетических полиморфизмов и их сочетаний, не учитывается половая специфичность.

За прототип выбрана выявленная в научно-медицинской литературе статья, в которой описан способ прогнозирования риска развития хронической истинной экземы (далее ХИЭ) у индивидуумов мужского пола на основе данных о генетическом полиморфизме+250A/G Ltα [Ассоциация полиморфизма лимфотоксина α (+250 A/G Ltα) с формированием хронической истинной экземы [Электронный ресурс] / Я.Е. Денисова, М.И. Чурносков

// Современные проблемы науки и образования. - 2014. - №3. - Режим доступа: <http://www.science-education.ru/117-13677>]. Способ включает забор венозной крови, выделение геномной ДНК из периферической крови и анализ локуса +250 A/G Lta методом полимеразной цепной реакции (далее ПЦР) синтеза ДНК. Генотип +250GG Lta является фактором риска развития этого заболевания у мужчин, а протективным фактором - аллель +250A Lta. Недостатком прототипа является то, что не учитывается влияние на развитие ХИЭ других генетических полиморфизмов и их сочетаний.

Задачей настоящего исследования является расширение арсенала методов диагностики, а именно создание способа прогнозирования риска развития ХИЭ у мужчин на основе данных о SNP x SNP взаимодействиях и комбинации генотипов, ассоциированных с развитием ХИЭ у мужчин полиморфных локусов rs12130219, rs10888499, rs4363385 и rs12144049 гена FLG.

Технический результат использования изобретения – получение критериев оценки риска развития ХИЭ у мужчин, родившихся и проживающих в Центральном Черноземье России, имеющих русскую национальность и не являющихся родственниками, на основе данных о полиморфных локусах rs12130219, rs10888499, rs4363385 и rs12144049 гена FLG, включающий:

- выделение ДНК из периферической венозной крови;
- анализ полиморфизмов rs12130219, rs10888499, rs4363385 и rs12144049 гена FLG;
- выявление четырехлокусной модели SNP x SNP взаимодействий, включающей rs12130219 x rs10888499 x rs4363385 x rs12144049 гена FLG;
- прогнозирование высокого риска развития ХИЭ при комбинации генотипов rs12130219 AA x rs10888499 AC x rs4363385 CT x rs12144049 TC гена FLG.

Новизна и изобретательский уровень заключаются в том, что из уровня техники не известна возможность прогноза развития ХИЭ у мужчин на основе данных комбинации генотипов rs12130219 AA x rs10888499 AC x rs4363385 CT x rs12144049 TC гена FLG.

Способ осуществляют следующим образом:

Выделение геномной ДНК из периферической крови осуществляют методом фенольно-хлороформной экстракции (Mathew, 1984) в два этапа. На первом этапе к 4 мл крови с ЭДТА добавляют 25 мл лизирующего буфера, содержащего 320 мМ сахарозы, 1% тритон X-100, 5 мМ MgCl₂, 10 мМ трис-HCl (pH=7,6). Полученную смесь перемешивают и центрифугируют при 4°C, 4000 об/мин в течение 20 минут. После центрифугирования надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют 4 мл раствора, содержащего 25 мМ ЭДТА (pH=8,0) и 75 мМ NaCl, ресуспендируют. Затем прибавляют 0,4 мл 10% SDS, 35 мкл протеиназы К (10 мг/мл) и инкубируют образец при 37°C в течение 16 часов.

На втором этапе из полученного лизата последовательно проводят экстракцию ДНК равными объемами фенола, фенол-хлороформа (1:1) и хлороформа с центрифугированием при 4000 об/мин в течение 10 минут. После каждого центрифугирования производят отбор водной фазы. ДНК осаждают из раствора двумя объемами охлажденного 96% этанола. После лиофилизации полученную ДНК растворяют в бидистиллированной, деионизованной воде и хранят при -200С.

Анализ полиморфных маркеров rs12130219, rs10888499, rs4363385 и rs12144049 гена FLG осуществлялся методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на термоциклере CFX-96 Real-Time System (Bio-Rad) с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров и зондов [Elevated MMP-8 and decreased myeloperoxidase concentrations associate significantly with the risk for atherosclerosis disease and abdominal aortic aneurysm [Text] / P. Pradhan-Palikhe, P. Vikatmaa, T. Lajunen [et al.] // Scand. J. Immunol. – 2010. – Vol. 72, №

2. – Р. 150-157] (синтезированы в ООО «Тест - Ген» (Ульяновск)).

Аmplификация геномной ДНК производилась в реакционной смеси, суммарным объемом 10 мкл, включающей смесь для ПЦР ММР – 4 мкл, Taq-полимеразу - 2 мкл, исследуемый образец (~30 нг ДНК/мкл) - 1 мкл, деионизированная вода – 3 мкл.

5 Генотипирование исследуемых образцов осуществлялось с использованием программного обеспечения «CFX-Manager™» методом дискриминации аллелей по величинам относительных единиц флуоресценции (ОЕФ) (фиг. 1, фиг. 2, фиг. 3, фиг. 4).

Изобретение характеризуется фигурами:

10 Фиг. 1. Дискриминации аллелей методом детекции TaqMan зондов по данным величин ОЕФ (относительные единицы флуоресценции) каждого зонда на амплификаторе CFX96 с детектирующей системой в режиме реального времени полиморфизма rs12130219 FLG (● - AA, ■ - GG, ▲ - AG, ■ - отрицательный контроль).

15 Фиг. 2. Дискриминации аллелей методом детекции TaqMan зондов по данным величин ОЕФ (относительные единицы флуоресценции) каждого зонда на амплификаторе CFX96 с детектирующей системой в режиме реального времени полиморфизма rs10888499 FLG (● - AA, ■ - CC, ▲ - AC, ■ - отрицательный контроль).

20 Фиг. 3. Дискриминации аллелей методом детекции TaqMan зондов по данным величин ОЕФ (относительные единицы флуоресценции) каждого зонда на амплификаторе CFX96 с детектирующей системой в режиме реального времени полиморфизма rs4363385 FLG (● - TT, ■ - CC, ▲ - CT, ■ - отрицательный контроль).

25 Фиг. 4. Дискриминации аллелей методом детекции TaqMan зондов по данным величин ОЕФ (относительные единицы флуоресценции) каждого зонда на амплификаторе CFX96 с детектирующей системой в режиме реального времени полиморфизма rs 12144049 FLG (● - TT, ■ - CC, ▲ - TC, ■ - отрицательный контроль).

30 Для анализа SNP×SNP взаимодействий, ассоциированных с развитием ХИЭ у мужчин использовали метод снижения размерности MDR (Multifactor Dimensionality Reduction) в модификации Model-Based-MDR (MB-MDR). Проводили тестирование двух-, трех- и четырехлокусных комбинаций с учетом ковариат (пол, возраст). Для дальнейшего анализа отбирались наиболее значимые модели межгенных взаимодействий с учетом поправки Бонферрони. Далее, отобранные с учетом поправки Бонферрони наиболее значимые модели SNP×SNP взаимодействий, тестировались с помощью пермутационного теста (было выполнено 1000 пермутаций) (Беляева ТМ. Изучение ассоциаций гаплотипов полиморфизма гена FLG с развитием хронической истинной экземы у мужчин. Научные результаты биомедицинских исследований. 2020;6(2):160-171). За статистически значимый уровень принимали $p_{perm} < 0,05$.

35 Возможность использования предложенного способа для оценки прогнозирования риска развития ХИЭ мужчин подтверждает анализ результатов наблюдений 203 мужчин, из которых 113 больных с хронической истинной экземой и 90 индивидуумов контрольной группы (ХИЭ отсутствовала). Среди больных средний возраст – $42,73 \pm 17,53$ лет, от 18 до 86 лет, в контрольной группе средний возраст – $42,56 \pm 15,42$ лет, от 17 до 88 лет. Изучаемые группы включали мужчин, родившихся и проживающих в Центральном Черноземье России, имеющих русскую национальность и не являющихся родственниками. На проведение данного исследования у всех пациентов было получено информированное согласие. Работа выполнялась под контролем этического комитета 45 медицинского института НИУ «БелГУ» в период с 2013 по 2018 гг. На каждого пациента заполнялась специально разработанная анкета-опросник, которая включала следующие данные: возраст, пол, место рождения, наличие внешнесредовых факторов риска, жалобы (высыпания, зуд, нарушение сна), анамнестические данные (возраст,

возникновения заболевания, количество обострений в год, сезонность обострений, наличие наследственной отягощенности), осложнения заболевания, сопутствующая патология, результаты клинического и лабораторного обследований.

Клиническое и клинико-лабораторное обследование больных осуществлялось на базах ОБУЗ «Курский областной клинический кожно-венерологический диспансер» и ОБУЗ «Кожно-венерологический диспансер» г. Белгорода. В исследуемую группу больных включались пациенты с диагнозом хроническая истинная экзема, который устанавливался на основании жалоб, анамнеза, клинических проявлений, течения заболевания и лабораторных методов исследования (Федеральные клинические рекомендации, 2016). В контрольную группу включались индивидуумы без заболеваний кожи и соматической патологии, приводящей к вторичному поражению кожи. Группа контроля формировалась при профилактических осмотрах населения.

Типирование молекулярно-генетических маркеров осуществлялось на кафедре медико-биологических дисциплин факультета лечебного дела и педиатрии медицинского института Белгородского государственного национального исследовательского университета.

При изучении SNP x SNP взаимодействий наиболее значимой четырехлокусной моделью, вовлеченную в формирование ХИЭ у мужчин, является rs12130219 x rs10888499 x rs4363385 x rs12144049 гена FLG ($p_{perm} \leq 0,001$). С развитием заболевания наиболее значимая ассоциация выявлена для комбинации генотипов rs12130219 AA x rs10888499 AC x rs4363385 CT x rs12144049 TC ($\beta = 2,18$, $p = 0,04$), имеющей рисковую направленность.

В качестве примеров конкретного применения разработанного способа приведено обследование пациентов, родившихся и проживающих в Центральном Черноземье России, имеющих русскую национальность и не являющихся родственниками: проведено генетическое обследование по локусам rs12130219, rs10888499, rs4363385 и rs12144049 гена FLG.

Пример 1

У пациента С. была взята венозная кровь, проведено генотипирование ДНК-маркеров, анализ вовлеченности полиморфных локусов гена FLG, была выявлена модель SNP x SNP взаимодействий, включающая rs12130219 x rs10888499 x rs4363385 x rs12144049 гена FLG, установлена комбинация генотипов rs12130219 AA x rs10888499 AC x rs4363385 CT x rs12144049 TC, что позволило отнести пациента в группу больных с повышенным риском развития ХИЭ.

Пример 2

У пациента Ф. была взята венозная кровь, проведено генотипирование ДНК-маркеров, анализ вовлеченности полиморфных локусов гена FLG, была выявлена модель SNP x SNP взаимодействий, включающая rs12130219 x rs10888499 x rs4363385 x rs12144049 гена FLG, установлена комбинация генотипов rs12130219 AA x rs10888499 AA x rs4363385 CC x rs12144049 TC, что позволило отнести пациента в группу больных с низким риском развития ХИЭ.

Дальнейшее наблюдение подтвердило отсутствие диагноза хронической истинной экземы у пациента.

Применение данного способа позволит на доклиническом этапе формировать среди индивидуумов группу риска и своевременно реализовывать в этих группах необходимые лечебно-профилактические мероприятия по предупреждению развития ХИЭ у мужчин.

(57) Формула изобретения

Способ прогнозирования повышенного риска развития хронической истинной экземы у мужчин, родившихся и проживающих в Центральном Черноземье России, имеющих русскую национальность и не являющихся родственниками, включающий выделение ДНК из периферической венозной крови, отличающийся тем, что проводят анализ полиморфизмов rs12130219, rs10888499, rs4363385 и rs12144049 гена FLG; выявляют четырехлокусную модель SNP x SNP взаимодействий, включающую rs12130219 x rs10888499 x rs4363385 x rs12144049 гена FLG; и прогнозируют высокий риск развития хронической истинной экземы у мужчин при комбинации генотипов rs12130219 AA x rs10888499 AC x rs4363385 CT x rs12144049 TC гена FLG.

10

15

20

25

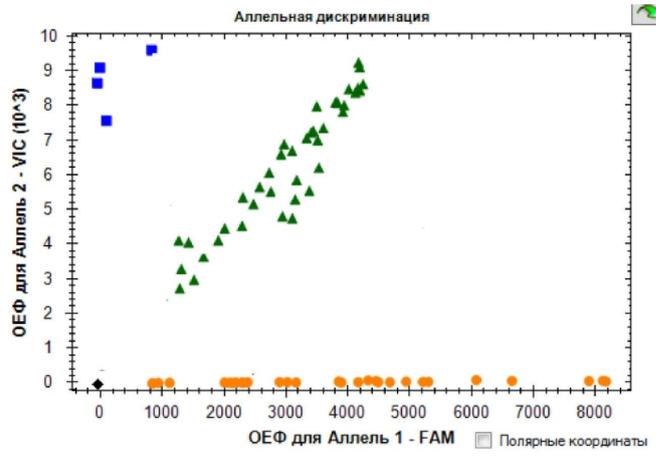
30

35

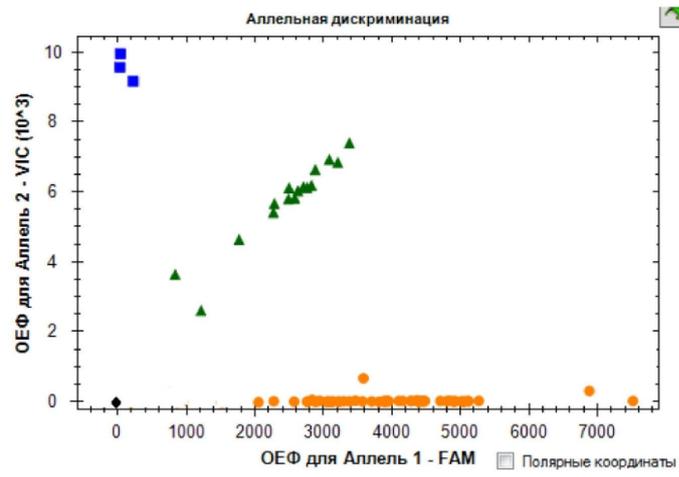
40

45

1



Фиг.1



Фиг.2

2

