



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014146405/15, 19.11.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
19.11.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 19.11.2014

(43) Дата публикации заявки: 10.06.2016 Бюл. № 16

(45) Опубликовано: 20.09.2016 Бюл. № 26

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 8182990 B2, 22.05.2012; RU 2483306 C1, 27.05.2013. LIN H.J. et al. Association of tumour necrosis factor alpha -308 gene polymorphism with primary open-angle glaucoma in Chinese. Eye (Lond). 2003 Jan; 17(1): 31-34 [Найдено 02.03.2016] [он-лайн], Найдено из Интернет: URL: <http://www.nature.com/eye/journal/v17/n1/full/6700227a.html>. BOZKURT B. et (см. прод.)

Адрес для переписки:

308015, Белгородская обл., г. Белгород, ул.
Победы, 85, НИУ "БелГУ" Токтарева Татьяна
Михайловна

(72) Автор(ы):

Чурносов Михаил Иванович (RU),
Овчарова Вероника Сергеевна (RU),
Тикунова Евгения Викторовна (RU),
Руженков Виктор Александрович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования
"Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет" (НИУ "БелГУ") (RU)

(54) СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РИСКА РАЗВИТИЯ ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМЫ У ИНДИВИДУУМОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ/ОТСУТСТВИЯ СОПУТСТВУЮЩЕЙ ПАТОЛОГИИ ГЛАЗ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицинской диагностики и предназначено для прогнозирования риска развития первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ). У индивидуумов русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья России, из периферической венозной крови выделяют ДНК, после чего проводят анализ полиморфизмов генов TNF α , Lta, TNFR1 и TNFR2. Среди индивидуумов без сопутствующей патологии глаз в случае выявления комбинации -308G TNF α и +1663G TNFR2 либо комбинации +36G TNFR1 и +1663G TNFR2 или при наличии

сопутствующей патологии глаз как миопия, катаракта или возрастная макулярная дегенерация сетчатки в случае выявления +36A TNFR1 либо комбинации +36AA TNFR1 и +1663A TNFR2 либо +250G Lta и +36AA TNFR1 прогнозируют повышенный риск развития ПОУГ. У индивидуумов с сопутствующей патологией глаз при выявлении +250A Lta и +36G TNFR1 либо -308G TNF α и +36G TNFR1 прогнозируют низкий риск развития ПОУГ. Изобретение обеспечивает раннее выявление больных с ПОУГ, что позволит предупредить прогрессирование заболевания. 6 ил., 2 табл., 7 пр.

(56) (продолжение):

a1. Association of tumour necrosis factor-alpha -308 G/A polymorphism with primary open-angle glaucoma. Clin Experiment Ophthalmol. 2012 May-Jun; 40(4): e156-e162. Epub 2011 Jul 26 [Найдено 02.03.2016] [онлайн], Найдено из Интернет: URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1442-9071.2011.02595.x/pdf>.

R U 2 5 9 7 7 8 4 C 2

R U 2 5 9 7 7 8 4 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

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

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2014146405/15, 19.11.2014

(24) Effective date for property rights:
19.11.2014

Priority:

(22) Date of filing: 19.11.2014

(43) Application published: 10.06.2016 Bull. № 16

(45) Date of publication: 20.09.2016 Bull. № 26

Mail address:

308015, obl. Belgorodskaya, g. Belgorod, ul. Pobedy,
d. 85, NIU "BelGU" Toktareva Tatyana Mikhajlovna

(72) Inventor(s):

Churnosov Mikhail Ivanovich (RU),
Ovcharova Veronika Sergeevna (RU),
Tikunova Evgeniya Viktorovna (RU),
Ruzhenkov Viktor Aleksandrovich (RU)

(73) Proprietor(s):

Federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
professionalnogo obrazovaniya "Belgorodskij
gosudarstvennyj natsionalnyj issledovatel'skij
universitet" (NIU "BelGU") (RU)(54) **METHOD FOR PREDICTION OF RISK OF DEVELOPING PRIMARY OPEN-ANGLE GLAUCOMA IN INDIVIDUALS DEPENDING ON PRESENCE/ABSENCE OF COMORBIDITY OF EYES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medical diagnostics and aims at predicting risk of developing primary open-angle glaucoma (POAG). In Russian individuals that are natives of Central Chernozem Region of Russia, DNA is extracted from peripheral venous blood, followed by analysis of gene polymorphisms TNF α , Lt α , TNFR1 and TNFR2. Among individuals without comorbidity of eye upon observing a combination -308G TNF α and +1663G TNFR2 or a combination +36G TNFR1 and +1663G TNFR2 or upon observing comorbidity of eyes as

myopia, cataract or age-related macular degeneration of retina upon detecting +36A TNFR1 or a combination +36AA TNFR1 and +1663A TNFR2 or +250G Lt α and +36AA TNFR1 a high risk of POAG is predicted. In individuals with comorbidity of eyes when observing +250A Lt α and +36G TNFR1 or -308G TNF α and +36G TNFR1 predicting low risk of POAG.

EFFECT: invention provides early detection of patients with POAG, thus preventing progression of disease.

1 cl, 6 dwg, 2 tbl, 7 ex

RU 2 597 784 C 2

RU 2 597 784 C 2

Изобретение относится к области медицинской диагностики, может быть использовано для прогнозирования риска развития первичной открытоугольной глаукомы (далее ПОУГ) в зависимости от наличия/отсутствия сопутствующей патологии глаз.

5 Глаукома - одна из наиболее тяжелых форм офтальмопатологии, имеющая большое медико-социальное значение ввиду высокой распространенности, постоянного роста заболеваемости и тяжести исходов заболевания, ведущего к слепоте и инвалидности. Среди клинических форм заболевания наиболее распространенной является первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ), на долю которой приходится от 72,3 до 96,1% всех
10 форм глауком [Глаукома: нац. руководство /под ред. Е.А. Егорова - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 824 с.]. ПОУГ - мультифакториальное заболевание глаз, характеризующееся повышением внутриглазного давления за пределы толерантного для зрительного нерва уровня, глаукомной оптической нейропатией и типичным снижением зрительных функций [Глаукома /А.П. Нестеров. - М.: ООО "Медицинское
15 информационное агентство", 2008. - 360 с.]. Установлено, что в возрастной группе до 59 лет распространенность ПОУГ составляет 0,88 случая на 1000 человек, от 60 до 70 - 6,44 на 1000 человек, среди лиц старше 75 лет глаукома встречается с частотой 17,3 на 1000 населения.

В настоящее время важное этиопатогенетическое значение при ПОУГ придается
20 нарушениям в системе апоптоза [Роль апоптоза и метаболизма мюллеровских клеток при экспериментальной глаукоме /В.Н. Алексеев, Е.Б. Мартынова, И.А. Самусенко. - Клин. Офтальмология, 2005. - №2. - с.52-55]. Одно из центральных звеньев в этом процессе занимают факторы некроза опухолей и их рецепторы [Glaucomatous neurodegeneration: An eye on tumor necrosis factor-alpha /R. Agarwal, P. Agarwal //Indian. J.
25 Ophthalmol. - 2012. - Vol.60. - P. 255]. Обладая множеством медико-биологических эффектов, эти цитокины могут влиять на развитие и прогрессирование ПОУГ [Association of TNF- α and TNF- β Gene Polymorphisms with Primary Open Angle and Primary Angle Closure Glaucoma /N.M. Al-Dabbagh, N. Al-Dohayan, A. Al-Asmari, M. Arfin, M. Tariq //In: Tomas Kubena, editor. The Mystery of Glaucoma. InTech. - 2011. - P. 229-256].

30 TNF α - многофункциональный цитокин, обеспечивающий широкий спектр биологических сигналов [Цитокины иммунной системы: основные свойства и иммунобиологическая активность /К.П. Кашкин //Клин. лабораторная диагностика. - 1998. - №11. - С. 21]. Запуская различные интрацеллюлярные процессы, TNF α контролирует жизнедеятельность различных клеток путем инициации апоптоза. На
35 экспериментальных моделях *in vitro* было показано, что TNF α инициирует астроглиоз - процесс усиления пролиферации астроцитов [Human astrocytes proliferate in response to tumor necrosis factor alpha /B.P. Varma, M.L. Estes, B.S. Jacobs et al. //Exp. Neurol. - 1990. - Vol.30. - P. 239-243], а следовательно, еще большую выработку TNF α , который, связываясь со своими рецепторами, инициирует процесс клеточной гибели. При этом
40 характер и интенсивность процесса гибели клеток определяется количеством воздействующего на них TNF α , что дает основание предположить дозозависимость влияния цитокина.

Ген, кодирующий белок TNF α , включает 4 экзона и 3 интрона, имеет размер 2762 п.н. и картируется в геноме человека на коротком плече шестой хромосомы (6p21.3),
45 располагаясь рядом с генами главного комплекса гистосовместимости [Tumor Necrosis Factor and Lymphotoxin Alfa Genetic Polymorphisms and Outcome in Pediatric Patients With Non-Hodgkin's Lymphoma: Results From Berlin-Frankfurt-Münster Trial NHL-BFM 95 /K. Seidemann [et al.] //Journal of Clinical Oncology. - 2005. - Vol.23. - №33. - P. 8414-8421].

Самым распространенным видом мутаций гена TNF α являются однонуклеотидные замены в промоторном регионе. Известно более 30 полиморфных вариантов этого гена, но только около половины из них влияют на экспрессию TNF α *in vivo*. Для большинства из них установлено влияние на уровень транскрипционной активности промотора гена TNF α , а следовательно, и на продукцию самого цитокина.

TNF β (лимфотоксин- α , Lt α) представляет собой гликопротеид, содержащий 171 аминокислотных остатков и имеющий молекулярную массу около 33 кДа. Ген Lt α расположен на шестой хромосоме (6p21.3), находясь в 1100 полинуклеотидных оснований от гена TNF α . Ген лимфотоксина имеет сходную с геном фактора некроза опухолей экзон-интронную структуру. Степень аминокислотной гомологии TNF β и TNF α составляет около 30% [Tandem arrangement of the genes coding for tumor necrosis factor (TNF-alpha) and lymphotoxin (TNF-beta) in the human genome /S.A. Nedospasov, A.N. Shakhov, R.L. Turetskaya et al. //Cold Sping Harbor Symp. Quant. Biol. - 1986. - Vol.51. - P. 611-625]. Таким образом, Lt α обладает рядом подобных TNF α биологических активностей [Cytokine gene polymorphism in human disease /M.V. Hollegaard, J.L. Bidwell // Genes Immun. - 2006. - Vol.7. - Suppl. 3. - P. 269-276], связываясь с теми же рецепторами, что и TNF α .

Факторы некроза опухолей TNF α , Lt α проявляют свои действия, связываясь с высокоаффинными рецепторами на поверхности клетки, что приводит к возникновению широкого спектра ответов клетки, включая активацию транскрипции генов и индукцию апоптоза [Interleukin 1 (IL-1) and tumour necrosis factor (TNF) signal transduction /J. Saklatvala, W. Davis, F. Guesdon //Philos Trans R Soc Lond B Biogr. Sci. - 1996. - Vol.351. - P. 151-157]. В настоящее время идентифицированы два типа рецепторов TNF α : TNFR1 и TNFR2.

TNFR1 представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 55 кДа и состоит из 435 аминокислот, а TNFR2 - гликопротеин, имеющий молекулярную массу 75 кДа и включающий 440 аминокислот. Ген TNFR1 у человека расположен на хромосоме 12p13 [TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship /H.T. Idriss, J.H. Naismith //Microsc. Res. Tech. - 2000. - Vol.50. - №3. - P. 184-195]. Ген TNFR2 локализован в хромосоме 1p36.2 и состоит из 10 экзонов.

Для оценки сложившейся патентной ситуации был выполнен поиск по охраняемым документам за период с 1990 по 2012 гг. Анализ документов производился по направлению: способ прогнозирования риска развития первичной открытоугольной глаукомы в зависимости от сопутствующей патологии глаз на основе молекулярно-генетических данных в зависимости от полиморфных маркеров генов факторов некроза опухолей и их рецепторов.

В изученной научно-медицинской и доступной патентной литературе авторами не было обнаружено способа прогнозирования риска развития первичной открытоугольной глаукомы в зависимости от наличия или отсутствия сопутствующей патологии глаз как, например, миопия, катаракта или возрастная макулярная дегенерация сетчатки, на основе данных о генетических полиморфизмах -308G/A TNF α , +250A/G Lt α , +36A/G TNFR1, +1663A/G TNFR2 и их сочетаний.

За прототип выбран патент РФ №2483306 (опубликован 27.05.2013), в котором описан способ прогнозирования заболевания первичной открытоугольной глаукомы путем забора слезной жидкости и крови, исследования слезной жидкости и сыворотки крови методом иммуноферментного анализа с использованием специфических тест-систем. Повышенные уровни металлопротеиназы-9 (ММР-9), показатели которой превышают 52,5 нг/мл в слезной жидкости и 274,49 нг/мл в сыворотке крови; повышенные уровни комплекса металлопротеиназы-9 с ее тканевым ингибитором

(MMP-9/TIMP-1), показатели которого превышают 0,19 нг/мл в слезной жидкости и 4,93 нг/мл в сыворотке крови, и повышенные уровни секреторного иммуноглобулина А (sIgA), показатели которого превышают 47,38 мг/л в слезной жидкости и 2,1 г/л в сыворотке крови, являются критериями, диагностирующими первичную
 5 открытоугольную глаукому. Этот способ может быть использован для ранней диагностики первичной открытоугольной глаукомы у пациентов, страдающих миопией, гипертонической болезнью, сахарным диабетом 2 типа и относящихся к группе риска развития заболевания.

К недостаткам данного способа относится то, что он не учитывает роль генетических полиморфизмов и, кроме того, предусматривает необходимость проводить исследования
 10 двух биологических проб: слезной жидкости и сыворотки крови.

Задачей настоящего исследования является устранение недостатков прототипа.

Технический результат использования изобретения - получение критериев оценки риска развития ПОУГ в зависимости от наличия такой сопутствующей патологии глаз
 15 как миопия, катаракта или возрастная макулярная дегенерация сетчатки, для индивидуумов русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья России на основе данных о генетических полиморфизмах -308G/A TNF α , +250A/G Lta, +36A/G TNFR1, +1663A/G TNFR2 и их сочетаний.

В соответствии с поставленной задачей был разработан способ прогнозирования
 20 риска развития первичной открытоугольной глаукомы в зависимости от сопутствующей патологии глаз, включающий:

- забор крови;
- выделение ДНК из периферической венозной крови;
- анализ полиморфизмов генов -308G/A TNF α , +250A/G Lta, +36A/G TNFR1, +1663A/G

25 TNFR2;

- прогнозирование повышенного риска развития первичной открытоугольной глаукомы среди индивидуумов с сопутствующей патологией глаз в случае выявления аллеля +36A TNFR1 либо комбинации генотипа +36AA TNFR1 с аллелем +1663A TNFR2
 либо комбинации аллеля +250G Lta с генотипом +36AA TNFR1;

30 - прогнозирование повышенного риска развития первичной открытоугольной глаукомы среди индивидуумов без сопутствующей патологии глаз в случае выявления комбинации аллеля -308G TNF α с аллелем +1663G TNFR2 либо комбинации аллеля +36G TNFR1 с аллелем +1663G TNFR2;

35 - прогнозирование низкого риска развития данного заболевания у индивидуумов с сопутствующей патологией глаз при выявлении комбинации аллеля +250A Lta с аллелем +36G TNFR1 либо комбинации аллеля -308G TNF α с аллелем +36G TNFR1.

Новизна и изобретательский уровень заключается в том, что из уровня техники не известна возможность прогноза риска развития первичной открытоугольной глаукомы
 40 у индивидуумов русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья России, в зависимости от сопутствующей патологии глаз по данным о генетических полиморфизмах -308G/A TNF α , +250A/G Lta, +36A/G TNFR1, +1663A/G TNFR2 и их сочетаний.

Изобретение охарактеризовано на следующих фигурах.

На фиг. 1 представлена дискриминация аллелей по локусу -308G/A TNF α , где ● -308AA TNF α , ■ -308GG TNF α , ▲ -308GA TNF α , ◆ - отрицательный контроль.

На фиг. 2 представлена дискриминация аллелей по локусу +250A/G Lta, где ● +250GG Lta, ■ +250AA Lta, ▲ +250AG Lta, ◆ - отрицательный контроль.

На фиг. 3 представлена дискриминация аллелей по локусу +36A/G TNFR1, где ● +36AA

TNFR1, ■+36GG TNFR1, ▲+36AG TNFR1, ◆- отрицательный контроль.

На фиг. 4 представлена дискриминация аллелей по локусу +1663A/G TNFR2, где ■+1663GG TNFR2, ■+1663AA TNFR2, ▲+1663AG TNFR2, ◆- отрицательный контроль.

На фиг. 5 показан вклад генов факторов некроза опухолей и их рецепторов в генетическую предрасположенность к ПОУГ у индивидуумов с сопутствующей патологией глаз.

На фиг. 6 показан вклад генов факторов некроза опухолей и их рецепторов в генетическую предрасположенность к ПОУГ у индивидуумов без сопутствующей патологии глаз.

На фигурах 1-4 две полосы, вертикальная и горизонтальная, делят график на четыре секции: одна для каждого гомозиготного состояния, одна для гетерозиготного состояния и секция без реакции. Присвоение генотипов неизвестным образцам определяется вычерчиванием уровня относительной флуоресценции (далее УОФ) для одного флуорофора на оси x, относительно УОФ для другого флуорофора на оси y на диаграмме дискриминации аллелей. Зонд с флуоресцентным красителем ROX соответствует аллелю А, зонд с красителем FAM - аллелю G.

- Если значения УОФ неизвестного образца находятся выше горизонтальной полосы и правее вертикальной полосы, генотип гетерозиготен (GA).

- Если значения УОФ неизвестного образца находятся выше горизонтальной полосы и левее вертикальной полосы, генотип гомозиготен по аллелю А (УОФ аллеля А отложены по оси y).

- Если значения УОФ неизвестного образца находятся ниже горизонтальной полосы и правее вертикальной, генотип гомозиготен по аллелю G (УОФ аллеля G отложены по оси x).

- Если значения УОФ неизвестного образца находятся ниже горизонтальной полосы и левее вертикальной, определение генотипа невозможно: в данном случае неопределенный образец - отрицательный контроль.

Способ осуществляют следующим образом.

ДНК выделяют из образцов периферической венозной крови индивидуумов в 2 этапа. На первом этапе к 4 мл крови 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, ресуспензируют. 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. Сформированную ДНК растворяют в бидистиллированной, деионизованной воде и хранят при -20°C. Выделенную ДНК используют для проведения полимеразной цепной реакции синтеза ДНК.

Анализ всех локусов -308G/A TNF α , +250G/A Lta, +36A/G TNFR1, +1663A/G TNFR2 осуществляют методами полимеразной цепной реакции (далее ПЦР) синтеза ДНК. ПЦР проводят на аппарате IQ5 (Bio-Rad) в режиме real time с использованием ДНК-полимеразы *Thermus aquaticus* производства фирмы «Силекс-М» и олигонуклеотидных праймеров и зондов, синтезированных фирмой «Синтол» с последующим анализом

полиморфизмов методом дискриминации аллелей (фиг.1-4). Для дискриминации аллелей используют программу Bio-Rad «IQ5-Standart Edition».

Возможность использования предложенного способа для оценки риска развития первичной открытоугольной глаукомы в зависимости от наличия миопии, катаракты или возрастной макулярной дегенерации сетчатки у индивидуумов подтверждает анализ результатов наблюдений 252 человек (450 глаз) с ПОУГ и 191 человек (382 глаза) контрольной группы. Формирование выборок больных и контроля осуществлялись на базе отделения микрохирургии глаза Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа.

Критерии включения в исследуемые выборки:

1. Индивидуумы русской национальности, являющиеся уроженцами Центрального Черноземья РФ и не имеющие родства между собой.

2. Добровольное согласие пациентов на проведение исследования.

3. В группу больных включались индивидуумы с впервые установленным или подтвержденным диагнозом глаукомы. Диагностика осуществлялась на основании результатов, общепринятых в мировой офтальмологической практике стандартов по исследованию ДЗН и состоянию полей зрения с учетом данных офтальмотонометрии [Национальное руководство по глаукоме, 2011].

4. В контрольную группу, включались индивидуумы, не имеющие острых заболеваний глаз на момент обследования, а также соматической патологии, приводящей к вторичному поражению глаз.

Критерии исключения из исследуемых выборок:

1. Пациенты с вторичной глаукомой любой этиологии, а также пациенты с закрытым иридокорнеальным углом.

2. Больные, у которых глаукома сочеталась с иной глазной патологией или системным заболеванием, влияющими на состояние поля зрения.

3. Наличие тяжелой соматической патологии (сердечная, дыхательная, почечная недостаточность).

4. Индивидуумы, отказавшиеся от проводимого исследования.

Среди больных ПОУГ (450 глаз) сопутствующая патология глаз была зарегистрирована в 72% случаев (324 глаза), а отсутствие патологии глаз наблюдалось соответственно у 28% (126 глаз). В контрольной группе (382 глаза) сопутствующая патология глаз была выявлена в 22,51% случаев (86 глаз), а ее отсутствие в 77,49% (296 глаз) ($\chi^2=200,46$, $p=0,0005$).

Типирование молекулярно-генетических маркеров осуществлялось в лаборатории «Молекулярной генетики человека» медицинского института Белгородского государственного национального исследовательского университета.

Формирование базы данных и статистические расчеты осуществлялись с использованием программы «STATISTICA 6.0». Ассоциации аллелей и генотипов изученных ДНК-маркеров с развитием ПОУГ в зависимости от сопутствующей патологии глаз оценивали с помощью анализа таблиц сопряженности 2x2 с расчетом критерия χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность и отношения шансов (OR) с 95% доверительными интервалами (CI). Изучение роли комбинаций генетических вариантов -308G/A TNF α , +250G/A Lt α , +36A/G TNFR1, +1663A/G TNFR2 в формирование ПОУГ в зависимости от сопутствующей патологии глаз проводилось с помощью программного обеспечения APSampler [<http://sources.redhat.com/cygwin/>], использующего метод Монте-Карло марковскими цепями и байесовскую непараметрическую статистику. С целью минимизации ошибок 1-го рода, связанных с получением ложноположительных

результатов при проведении множественных сравнений, вводили поправку Бонферрони - производили перерасчет уровня значимости p для множественных парных сравнений по формуле: $p_{cor}=p \times n$, где p - полученный уровень статистической значимости, n - количество парных сравнений. За статистически значимый уровень принимали $p_{cor} \leq 0,05$ [Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA [Текст] /О.Ю. Реброва. - [3-е изд.]. - Москва: Медиа Сфера, 2006. - 305 с.: ил.; Боровиков В.П. Statistica: искусство анализа данных на компьютере [Текст] /В.П. Боровиков. - 2-е изд. - Санкт-Петербург: Питер, 2003. - 688 с.].

Установлено, что пациенты с сопутствующей патологией глаз больные ПОУГ имеют наибольшую частоту аллеля +36A TNFR1 (51,72%) по сравнению с контрольной группой без ПОУГ (40,36%, $\chi^2=6,36$, $p=0,01$, OR=1,58, 95% CI 1,10-2,27).

С помощью биоинформатических исследований выявлен целый ряд достоверных различий между больными с ПОУГ и контролем с сопутствующей патологией глаз (таб.1).

Сравнительный анализ сочетаний аллелей и генотипов полиморфных маркеров цитокинов у пациентов с сопутствующей патологией глаз с ПОУГ и в контрольной группе без ПОУГ (%)

Таблица 1

Полиморфизмы	Сочетание (аллели/генотипы)	Контрольная группа (n=86 глаз)		Больные ПОУГ (n=324 глаз)		χ^2 P (P _{cor})	OR (95% CI)
		n/N	%	n/N	%		
+36A/G TNFR1 +1663A/G TNFR2	+36AA TNFR1 совместно с +1663A TNFR2	3/79	3,80	55/318	17,30	$\chi^2=8,19$ P=0,0008 P _{cor} =0,005	5,30 (1,61-17,41)
+250A/G LT α +36A/G TNFR1	+250A LT α совместно с +36G TNFR1	63/77	81,82	214/320	66,88	$\chi^2=5,88$ P=0,006 P _{cor} =0,02	0,45 (0,24-0,84)
+250A/G LT α +36A/G TNFR1	+250G LT α совместно с +36AA TNFR1	2/77	2,60	37/320	11,56	$\chi^2=4,67$ P=0,009 P _{cor} =0,05	4,90 (1,15-20,81)
-308G/A TNF α +36A/G TNFR1	-308G TNF α совместно с +36G TNFR1	71/83	85,54	231/317	72,87	$\chi^2=5,05$ P=0,01 P _{cor} =0,04	0,45 (0,23-0,88)

Установлено, что комбинация генотипа +36AA TNFR1 с аллелем +1663A TNFR2 встречается среди больных с ПОУГ в 17,30% случаев, что в 4,55 раз чаще, чем в контроле (3,80%, $\chi^2=8,19$, $p=0,0008$, $p_{cor}=0,005$), а распространенность сочетания аллеля +250G LT α с генотипом +36AA TNFR1 между больными с ПОУГ в 11,56% случаев, что в 4,45 раз выше, чем в контроле (2,60%, $\chi^2=4,67$, $p=0,009$, $p_{cor}=0,05$). Следовательно, данные комбинации являются факторами риска формирования ПОУГ при сопутствующей патологии глаз (OR=5,30 и OR=4,90 соответственно). Наоборот, среди пациентов контрольной группы наблюдаются более высокие частоты сочетаний аллеля +250A LT α с аллелем +36G TNFR1 (81,82%) либо аллеля -308G TNF α с аллелем +36G TNFR1 (85,54%) по сравнению с группой с ПОУГ (66,88%, $\chi^2=5,88$, $p=0,006$, $p_{cor}=0,02$ и 72,87%, $\chi^2=5,05$, $p=0,01$, $p_{cor}=0,04$, соответственно). Таким образом, эти комбинации оказывают протективное влияние на формирование ПОУГ при сопутствующей патологии глаз (OR=0,45) (фиг. 5).

Установлено, что среди больных с ПОУГ без сопутствующей патологии глаз частоты сочетания аллеля -308G TNF α с аллелем +1663G TNFR2 (86,99%) либо сочетания аллеля +36G TNFR1 с аллелем +1663G TNFR2 (70,25%) статистически достоверно выше по сравнению с группой контроля без сопутствующей патологии глаз (76,05%, $\chi^2=5,52$, $p=0,008$, $p_{\text{cor}}=0,03$ и 58,11%, $\chi^2=4,69$, $p=0,01$, $p_{\text{cor}}=0,04$, соответственно). Следовательно наличие этих комбинаций генетических вариантов повышают риск развития ПОУГ у индивидуумов без сопутствующей патологии глаз (OR=2,11 и OR=1,70 соответственно) (таб.2, фиг. 6).

Сравнительный анализ сочетаний аллелей и генотипов полиморфных маркеров цитокинов у пациентов с ПОУГ и в контрольной группе (%) без сопутствующей патологии глаз

Таблица 2

Полиморфизмы	Сочетание (аллели/генотипы)	Контрольная группа (n=296 глаз)		Больные ПОУГ (n=126 глаз)		χ^2 P(P _{cor})	OR (95% CI)
		n/N	%	n/N	%		
-308G/A TNF α +1663A/G TNFR2	-308G TNF α совместно с +1663G TNFR2	200/263	76,05	107/123	86,99	$\chi^2=5,52$ P=0,008 P _{cor} =0,03	2,11 (1,16-3,83)
+36A/G TNFR1 +1663A/G TNFR2	+36G TNFR1 совместно с +1663G TNFR2	154/265	58,11	85/121	70,25	$\chi^2=4,69$ P=0,01 P _{cor} =0,04	1,70 (1,07-2,70)

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о вовлеченности генетических полиморфизмов -308G/A TNF α , +250G/A Lt α , +36A/G TNFR1, +1663A/G TNFR2 и их комбинаций в формирование ПОУГ в зависимости от сопутствующей патологии глаз, а именно: миопии, катаракты или возрастной макулярной дегенерации сетчатки.

Подверженность к формированию ПОУГ среди индивидуумов с сопутствующей патологией глаз определяют генетический вариант +36A TNFR1 (OR=1,58) и комбинации: +36AA TNFR1 с +1663A TNFR2 (OR=5,30) либо +250G Lt α с +36AA TNFR1 (OR=4,90). Развитие ПОУГ у индивидуумов без сопутствующей патологии глаз ассоциировано с комбинациями: -308G TNF α с +1663G TNFR2 (OR=2,11) либо +36G TNFR1 с +1663G TNFR2 (OR=1,70). При этом протективную направленность при развитии ПОУГ в группе больных с сопутствующей патологией глаз имеют комбинации: +250A Lt α с +36G TNFR1 (OR=0,45) либо -308G TNF α с +36G TNFR1 (OR=0,45).

Примеры, подтверждающие осуществимость предложенного изобретения.

1. Сочетание генотипа +36AA TNFR1 и аллеля +1663A TNFR2 было выявлено у пациента А., страдающего миопией средней степени, у пациента Б, имеющего возрастную катаракту, у пациента В, страдающего макулярной дегенерацией сетчатки. При дальнейшем детальном офтальмологическом обследовании у пациентов была обнаружена ПОУГ.

2. Сочетание генотипа +36AA TNFR1 и аллеля +250G Lt α было выявлено у пациента Г., страдающего миопией средней степени, у пациента Д, имеющего возрастную катаракту, у пациента Е, страдающего макулярной дегенерацией сетчатки. При дальнейшем детальном офтальмологическом обследовании у пациентов была обнаружена ПОУГ.

3. Сочетание аллеля +250A Lt α и аллеля +36G TNFR1 было выявлено у пациента И., страдающего миопией средней степени, у пациента К., имеющего возрастную катаракту, у пациента Л., страдающего макулярной дегенерацией сетчатки. При дальнейшем динамическом наблюдении ПОУГ у пациентов не обнаружена.

4. Сочетание аллеля -308G TNF α и аллеля +36G TNFR1 было выявлено у пациента М., страдающего миопией средней степени, у пациента Н., имеющего возрастную катаракту, у пациента П., страдающего макулярной дегенерацией сетчатки. При дальнейшем динамическом наблюдении ПОУГ у пациента не обнаружена.

5. Сочетание аллеля -308G TNF α и аллеля +1663G TNFR2 было выявлено у 100 индивидуумов без сопутствующей патологии глаз. При дальнейшем детальном офтальмологическом обследовании у них была обнаружена ПОУГ.

6. Сочетание аллеля +36G TNFR1 и аллеля +1663G TNFR2 было выявлено у 77 индивидуумов без сопутствующей патологии глаз. При дальнейшем детальном офтальмологическом обследовании у них была обнаружена ПОУГ.

7. Аллель +36A TNFR1 был выявлен у пациента Р., страдающего миопией средней степени, у пациента С., имеющего возрастную катаракту, у пациента Т., страдающего макулярной дегенерацией сетчатки. При дальнейшем детальном офтальмологическом обследовании у пациентов была обнаружена ПОУГ.

15. Использование данного способа позволяет прогнозировать риск возникновения ПОУГ у индивидуумов русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья России, в зависимости от наличия или отсутствия сопутствующей патологии глаз, а именно миопии, катаракты или возрастной макулярной дегенерации сетчатки, что будет способствовать более эффективной реализации лечебно-профилактических мероприятий по предупреждению развития ПОУГ и ее раннему выявлению с целью раннего начала лечения и предупреждения прогрессирования заболевания.

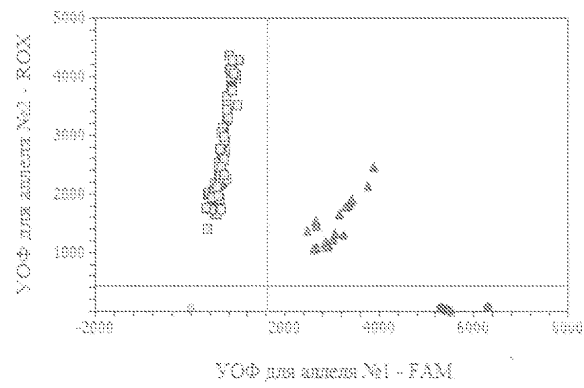
Формула изобретения

Способ прогнозирования риска развития первичной открытоугольной глаукомы, включающий забор крови, отличающийся тем, что после выделения ДНК из периферической венозной крови индивидуумов русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья России, проводят анализ полиморфизмов генов -308G/A TNF α , +250A/G Lt α , +36A/G TNFR1, +1663A/G TNFR2 и прогнозируют повышенный риск развития первичной открытоугольной глаукомы при наличии сопутствующей патологии глаз, как миопия, катаракта или возрастная макулярная дегенерация сетчатки, в случае выявления аллеля +36A TNFR1 либо комбинации генотипа +36AA TNFR1 с аллелем +1663A TNFR2 либо комбинации аллеля +250G Lt α с генотипом +36AA TNFR1; прогнозируют повышенный риск развития первичной открытоугольной глаукомы среди индивидуумов без сопутствующей патологии глаз в случае выявления комбинации аллеля -308G TNF α с аллелем +1663G TNFR2 либо комбинации аллеля +36G TNFR1 с аллелем +1663G TNFR2; прогнозируют низкий риск развития первичной открытоугольной глаукомы у индивидуумов с сопутствующей патологией глаз при выявлении комбинации аллеля +250A Lt α с аллелем +36G TNFR1 либо комбинации аллеля -308G TNF α с аллелем +36G TNFR1.

40

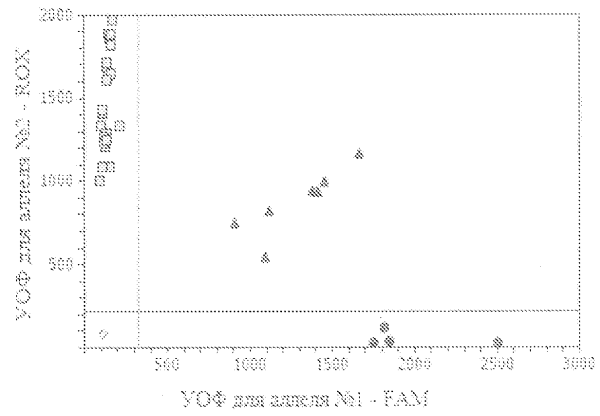
45

Способ прогнозирования риска развития
первичной открытоугольной глаукомы у
индивидуумов в зависимости от наличия/отсутствия
сопутствующей патологии глаза



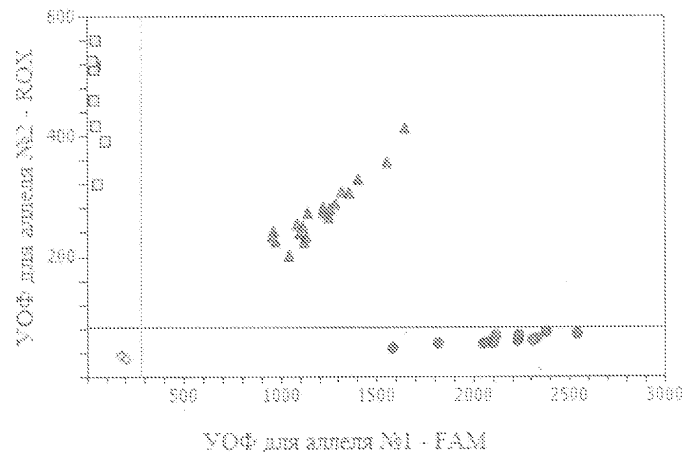
Фиг. 1

Способ прогнозирования риска развития
парамеи остроконечной глаукомы у
пациентов в зависимости от наличия/отсутствия
контактной патологии глаз



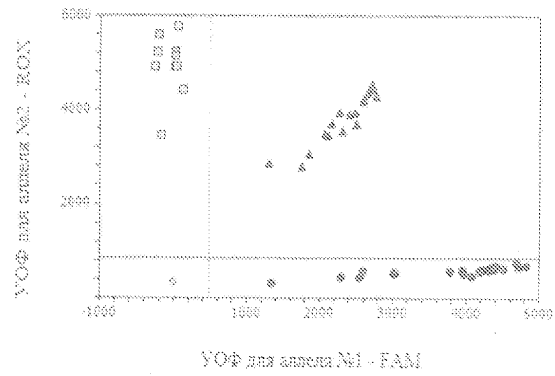
Фиг. 2

Способ прогнозирования риска развития
первичной открытоугольной глаукомы у
индивидуумов в зависимости от наличия/отсутствия
сопутствующей патологии глаз



Фиг. 3

Способ прогнозирования риска развития
первичной открытоугольной глаукомы у
взрослых людей в зависимости от наличия/отсутствия
симптомокомплексной патологии глаз



Фиг. 4

Способ прогнозирования риска развития первичной открытоугольной глаукомы у индивидуума в зависимости от максимальной соответствующей патологич. гла.

