



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 15/00 (2021.08); C12Q 1/68 (2021.08)

(21)(22) Заявка: 2021106442, 12.03.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
12.03.2021

Дата регистрации:
25.10.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 12.03.2021

(45) Опубликовано: 25.10.2021 Бюл. № 30

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: БЕЛЯЕВА Т. М., Роль
взаимодействия полиморфных локусов гена
FLG в формировании хронической истинной
экземы у женщин. Научные результаты
биомедицинских исследований. 2019; 5 (4): 5-
18, найдено в интернет 27.08.2021, адрес сайта:
<http://rrmedicine.ru/journal/annotation/1833/>.
БЕЛЯЕВА Т.М., Изучение ассоциаций
гаплотипов полиморфизма гена FLG с (см.
прод.)

(54) Способ прогнозирования риска развития хронической истинной экземы на основе молекулярно-генетических данных

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и биотехнологии, может быть использовано для выявления риска развития хронической истинной экземы у индивидуумов русской национальности, родившихся и проживающих в Центральном Черноземье России. Способ включает выделение ДНК из периферической венозной крови, анализ генетических полиморфизмов rs3126085, rs12144049, rs6661961, rs471144 и rs10888499 гена FLG. Гаплотип GCATA по локусам rs3126085,

rs12144049, rs6661961, rs471144 и rs10888499 гена FLG является фактором риска развития хронической истинной экземы (OR=5,48). Применение данного способа позволит на доклиническом этапе формировать среди индивидуумов группы риска и своевременно реализовывать в этих группах необходимые лечебно-профилактические мероприятия по предупреждению развития ХИЭ. 5 ил., 4 пр.

(56) (продолжение):

развитием хронической истинной экземы у мужчин. Научные результаты биомедицинских исследований, 2020; 6 (2): 160-171, найдено в интернет 27.08.2021, адрес сайта, <http://dSPACE.bsu.edu.ru/bitstream/123456789/>

R U 2 7 5 7 9 3 6 C 1

R U 2 7 5 7 9 3 6 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 15/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
C12N 15/00 (2021.08); *C12Q 1/68* (2021.08)

(21)(22) Application: **2021106442, 12.03.2021**

(24) Effective date for property rights:
12.03.2021

Registration date:
25.10.2021

Priority:

(22) Date of filing: **12.03.2021**

(45) Date of publication: **25.10.2021 Bull. № 30**

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 Mikhajlovna (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 THE RISK OF DEVELOPING CHRONIC TRUE ECZEMA BASED ON MOLECULAR GENETIC DATA

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to the field of medicine and biotechnology, can be used to identify the risk of developing chronic true eczema in individuals of Russian nationality, born and living in the Central Black Earth Region of Russia. The method includes isolation of DNA from peripheral venous blood, analysis of genetic polymorphisms rs3126085, rs12144049, rs6661961, rs471144 and rs10888499 of the FLG gene. The GCATA haplotype at loci

rs3126085, rs12144049, rs6661961, rs471144, and rs10888499 of the FLG gene is a risk factor for the development of chronic true eczema (OR=5.48).

EFFECT: use of this method will allow at the preclinical stage forming risk groups among individuals and timely implement in these groups the necessary therapeutic and prophylactic measures to prevent the development of CTE.

1 cl, 5 dwg, 4 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).

На разных этапах развития учений об экземе важное значение в этиологии и патогенезе экземы придавали неврогенной и аллергической теориям, роли эндокринной системы, наследственным факторам.

Заболевание оказывает серьезное негативное влияние на качество жизни больных (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). Экзема распространена у 10-20% детей, нередко манифестирует в раннем детстве, причем до 45% всех случаев заболевания проявляется в первые 6 месяцев жизни (Tanjung C., Rzehak P., Mansyur M., et al. Study protocol to investigate the environmental and genetic aetiology of atopic dermatitis: the Indonesian Prospective Study of Atopic Dermatitis in Infants (ISADI) // *BMJ Open.* 2017;7(3):e012475).

Экзема является мультифакторным заболеванием, развитие которого определяется полигенной основой (наследственная предрасположенность предопределяет различные нарушения со стороны кожных покровов, нервной, эндокринной, иммунной систем) и действием провоцирующих факторов экзогенной (бактериальные и грибковые инфекционные агенты, химические вещества, физические факторы, лекарственные препараты, пищевые продукты) и эндогенной (антигены микроорганизмов из очагов хронической инфекции) природы (Федеральные клинические рекомендации, 2016; Завадский В.Н. К вопросу классификации и патогенетической терапии дерматитов различного генеза, атопического дерматита и экземы. *Клиническая дерматология и венерология.* 2018;17(2):100-107). Близнецовые и семейные исследования свидетельствуют о существенной роли наследственных факторов (72-90%) в формировании экземы (Al-Afif K.A.M., Buraik M.A., Buddenkotte J., et al. Understanding the Burden of Atopic Dermatitis in Africa and the Middle East // *Dermatol Ther (Heidelb).* 2019;9(2):223–241). Вероятность возникновения заболевания составляет около 40% при наличии экземы у одного из родителей, и этот показатель достигает уровня 50-60% при наличии заболевания у обоих родителей (Федеральные клинические рекомендации, 2016).

Изучению молекулярно-генетических основ экземы посвящено достаточно большое количество работ. Активно проводится поиск генетических детерминант заболевания с использованием методов полно-геномного анализа ассоциаций (GWAS). К настоящему времени, согласно данным GWAS каталога (https://www.ebi.ac.uk/gwas/efotraits/EFO_0000274), в мире различными научными коллективами проведено одиннадцать полно-геномных исследований экземы (в зарубежных литературных источниках синонимом экземы является атопический дерматит [MIM 603165], в результате которых выявлено более 100 GWAS-значимых полиморфных локусов, вовлеченных в формирование заболевания).

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. Так же показаны ассоциации ряда полиморфных локусов гена филаггрина с развитием экземы и по данным полно-геномных исследований. При этом, следует

отметить, что подавляющее число работ, направленных на поиск молекулярно-генетических маркеров, ассоциированных с развитием экземы, выполнено за рубежом, а в России такие исследования единичные (Гималова Г.Ф., Карунас А.С., Федорова Ю.Ю., Гуменная Э.Р., Левашева С.В., Эткина Э.И., Хуснутдинова Э.К. Репликация данных полногеномных анализов ассоциации атопического дерматита в республике Башкортостан // Медицинская генетика. 2016;15(4):25-28).

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 pH 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 pH 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 как 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.) (Šepelak 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 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 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 и ее осложнений единичны и фрагментарны, а данные о роли генетических вариантов rs3126085, rs12144049, rs6661961, rs471144 и rs10888499 FLG в развитии ХИЭ 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 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 на основе данных о гаплотипе GCATA генетических полиморфизмов rs3126085, rs12144049, rs6661961, rs471144 и rs10888499 гена FLG, находящихся в неравновесии по сцеплению.

Известен способ прогнозирования риска раннего развития профессиональных аллергических дерматозов по патенту РФ №2467330 (опубликован 2012.11.20), включающий забор венозной крови, выделение генетического материала, проведение полимеразной 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 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 пириграмме отсутствия замены аденина на гуанин и при 5 воздействии на организм вредного производственного фактора раздражающего и сенсibiliзирующего действия прогнозируют риск раннего развития профессиональных аллергических дерматозов менее 40%, при выявлении на полученной пириграмме гетерозиготного варианта Cyp1A1*2C, обусловленного заменой аденина на гуанин в нуклеотидной последовательности в положении 4889, и при воздействии на организм 10 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.

Известен способ прогноза течения и оценки эффективности лечения атопического дерматита, который заключается в проведении клинического и лабораторного 15 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 20 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 25 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 так же то, что не 30 учитывается влияние на развитие ХИЭ генетических полиморфизмов и их сочетаний.

Из уровня техники известен способ прогнозирования среднетяжелого течения 35 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. 40 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.

За прототип выбрана выявленная в научно-медицинской литературе статья, в которой 45 описан способ прогнозирования риска развития хронической истинной экземы (далее ХИЭ) у индивидуумов мужского пола на основе данных о генетическом полиморфизме+250A/G Ltб [Ассоциация полиморфизма лимфотоксина б (+250 A/G Ltб) 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 Lt6 методом полимеразной цепной реакции (далее ПЦР) синтеза ДНК. Генотип+250GG Lt6 является фактором риска развития этого заболевания у мужчин, а протективным фактором - аллель +250A Lt6. Недостатком прототипа является узкая направленность, т.к. способ применим только для прогнозирования риска развития ХИЭ у индивидуумов мужского пола, а также 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 на основе данных о гаплотипе GCATA полиморфных локусов rs3126085, rs12144049, rs6661961, rs471144 и rs10888499 гена FLG, находящихся в неравновесии по сцеплению.

Технический результат использования изобретения – получение критериев оценки риска развития ХИЭ, родившихся и проживающих в Центральном Черноземье России, имеющих русскую национальность и не являющихся родственниками, на основе данных о полиморфных локусах rs3126085, rs12144049, rs6661961, rs471144 и rs10888499 гена FLG, включающий:

- выделение ДНК из периферической венозной крови;
- анализ полиморфизмов rs3126085, rs12144049, rs6661961, rs471144 и rs10888499 гена FLG;

- прогнозирование высокого риска развития ХИЭ при выявлении гаплотипа GCATA генетических полиморфизмов rs3126085, rs12144049, rs6661961, rs471144 и rs10888499 гена FLG.

Новизна и изобретательский уровень заключаются в том, что из уровня техники не известна возможность прогноза развития ХИЭ на основе данных о гаплотипе GCATA полиморфных локусов rs3126085, rs12144049, rs6661961, rs471144 и rs10888499 гена FLG, находящихся в неравновесии по сцеплению.

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 320мМ сахарозы, 1% тритон X-100, 5мМ MgCl₂, 10мМ 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 (10мг/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 -20°C.

Анализ полиморфных маркеров rs3126085, rs12144049, rs6661961, rs471144 и rs10888499 гена FLG осуществляли 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. – P. 150-157.] (синтезированы в ООО «Тест - Ген» (Ульяновск)).

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

Генотипирование исследуемых образцов осуществляли с использованием программного обеспечения «CFX-Manager™» методом дискриминации аллелей по величинам относительных единиц флуоресценции (далее ОЕФ) .

10 Изобретение характеризуется фигурами:

Фиг. 1. Дискриминации аллелей методом детекции TaqMan зондов по данным величин ОЕФ каждого зонда на амплификаторе CFX96 с детектирующей системой в режиме реального времени полиморфизма rs3126085 FLG (● - AA, ■ - GA, ▲ - GG, ■ - отрицательный контроль).

15 Фиг. 2. Дискриминации аллелей методом детекции TaqMan зондов по данным величин ОЕФ каждого зонда на амплификаторе CFX96 с детектирующей системой в режиме реального времени полиморфизма rs 12144049 FLG (● - TT, ■ - CC, ▲ - TC, ■ - отрицательный контроль).

20 Фиг. 3. Дискриминации аллелей методом детекции TaqMan зондов по данным величин ОЕФ каждого зонда на амплификаторе CFX96 с детектирующей системой в режиме реального времени полиморфизма rs 6661961 FLG (● - AA, ■ - TT, ▲ - AT, ■ - отрицательный контроль).

25 Фиг. 4. Дискриминации аллелей методом детекции TaqMan зондов по данным величин ОЕФ каждого зонда на амплификаторе CFX96 с детектирующей системой в режиме реального времени полиморфизма rs rs471144 FLG (● - TT, ■ - GG, ▲ - TG, ■ - отрицательный контроль).

30 Фиг. 5. Дискриминации аллелей методом детекции TaqMan зондов по данным величин ОЕФ каждого зонда на амплификаторе CFX96 с детектирующей системой в режиме реального времени полиморфизма rs10888499 FLG (● - AA, ■ - CC, ▲ - AC, ■ - отрицательный контроль).

С помощью программы Haploview v.4.2 (<https://www.broadinstitute.org/haploview/haploview>) проведен анализ неравновесия по сцеплению между парами SNPs и построены гапоблоки. С использованием коэффициента D' , предложенного Левонтином и коэффициента корреляции r^2 Пирсона оценивали неравновесие по сцеплению между
35 рядом расположенными SNPs. В соответствии с алгоритмами «Solid Spine» и «Four gamete frequencies» с заданным порогом $D' > 0,8$ определяли блочную структуру. (Беляева ТМ. Изучение ассоциаций гаплотипов полиморфизма гена FLG с развитием хронической истинной экземы у мужчин. Научные результаты биомедицинских исследований. 2020; 6(2):160-171).

40 Расчет частот гаплотипов и анализ их ассоциаций с формированием ХИЭ осуществляли с помощью программного обеспечения PLINK v. 2.050 (<http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/>) по EM-алгоритму. За статистически значимый уровень принимали $p_{perm} < 0,05$.

45 Возможность использования предложенного способа для оценки прогнозирования риска развития ХИЭ подтверждает анализ результатов наблюдений 656 пациентов, из которых 350 больных с хронической истинной экземой и 306 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.

Исследуемые группы включали индивидуумов, 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 медицинского института НИУ «БелГУ» в период с 2013 по 2018 гг.. На каждого пациента 5 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, возникновение заболевания, количество обострений в год, сезонность обострений, 10 наличие наследственной отягощенности), осложнения заболевания, сопутствующая патология, результаты клинического и лабораторного обследований.

Клиническое и клиничко-лабораторное обследование больных осуществляли на базах ОБУЗ «Курский областной клинический кожно-венерологический диспансер» и ОГБУЗ «Кожно-венерологический диспансер» г. Белгорода. В исследуемую группу больных 15 включали пациентов 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 включали индивидуумов без заболеваний кожи и соматической патологии, приводящей к вторичному поражению кожи. Группу контроля формировали 20 при профилактических осмотрах населения.

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

При расчете частот гаплотипов и анализе их ассоциаций с формированием ХИЭ 25 установлена связь с формированием заболевания гаплотипа GCATA полиморфных локусов rs3126085, rs12144049, rs6661961, rs471144 и rs10888499 гена FLG, находящихся в неравновесии по сцеплению. Гаплотип GCATA rs3126085, rs12144049, rs6661961, 30 rs471144 и rs10888499 является фактором риска развития ХИЭ (OR=5,48; p=0,003).

В качестве примеров конкретного применения разработанного способа приведено 35 обследование пациентов, родившихся и проживающих в Центральном Черноземье России, имеющих русскую национальность и не являющихся родственниками: проведено генетическое обследование по локусам rs3126085, rs12144049, rs6661961, rs471144 и 40 rs10888499 гена FLG.

Пример 1

У пациента С. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров был выявлен гаплотип GCATA по локусу rs3126085, rs12144049, rs6661961, rs471144 и 35 rs10888499 гена FLG, что позволило отнести пациента в группу больных с высоким риском развития ХИЭ. Дальнейшее наблюдение подтвердило диагноз хронической истинной экземы у пациента. 40

Пример 2

У пациентки И. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров был выявлен гаплотип GCATA по локусу rs3126085, rs12144049, rs6661961, rs471144 и 35 rs10888499 гена FLG, что позволило отнести пациентку в группу больных с высоким риском развития ХИЭ. Дальнейшее наблюдение подтвердило диагноз хронической истинной экземы. 45

Пример 3

У пациентки З. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров

был выявлен гаплотип ACATA по локусу rs3126085, rs12144049, rs6661961, rs471144 и rs10888499 гена FLG, что позволило отнести пациентку в группу с низким риском развития ХИЭ. Дальнейшее наблюдение не подтвердило диагноз хронической истинной экземы.

5 Пример 4

У пациента Ф. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров был выявлен гаплотип ACATA по локусу rs3126085, rs12144049, rs6661961, rs471144 и rs10888499 гена FLG, что позволило отнести пациента в группу с низким риском развития ХИЭ. Дальнейшее наблюдение не подтвердило диагноз хронической истинной экземы.

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

(57) Формула изобретения

15 Способ прогнозирования риска развития хронической истинной экземы у индивидуумов русской национальности, родившихся и проживающих в Центральном Черноземье России, включающий выделение ДНК из периферической венозной крови, анализ генетических маркеров гена филаггрина, отличающийся тем, что высокий риск развития хронической истинной экземы прогнозируют при выявлении гаплотипа ACATA
20 по локусам rs3126085, rs12144049, rs6661961, rs471144 и rs10888499 гена FLG, находящимся в неравновесии по сцеплению.

25

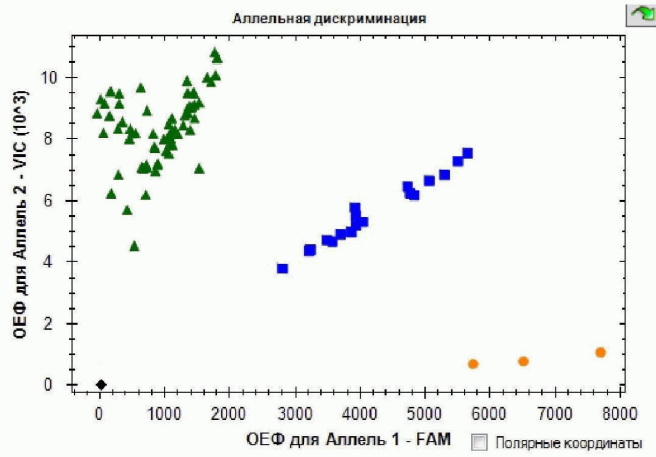
30

35

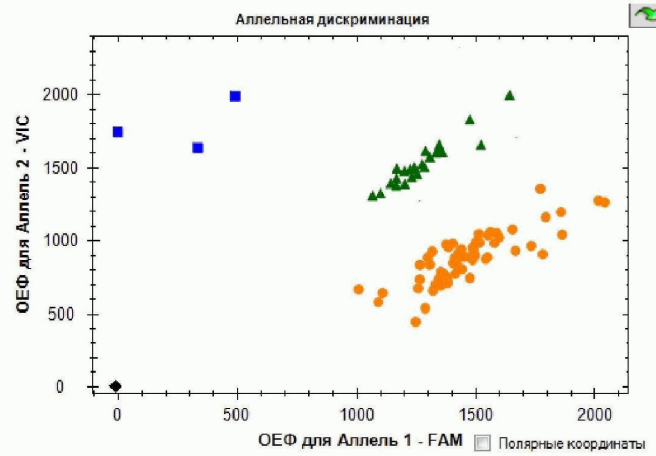
40

45

1

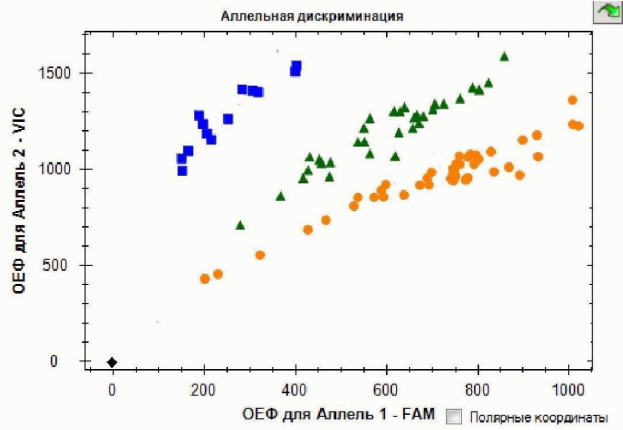


Фиг. 1

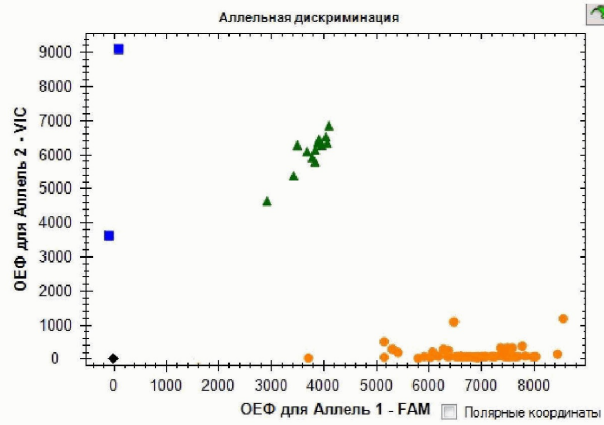


Фиг. 2.

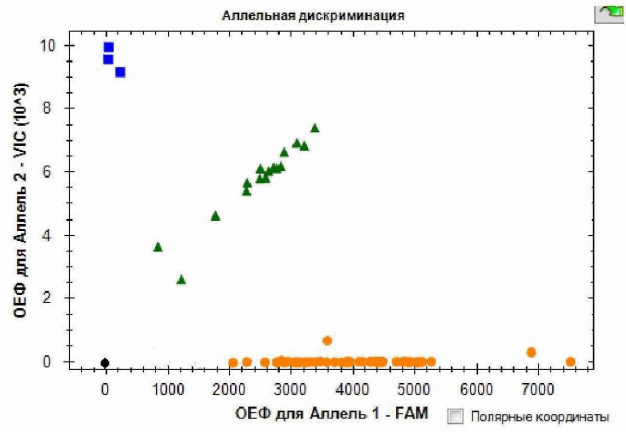
2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5