



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/49 (2021.05); G01N 33/58 (2021.05); C12Q 1/6806 (2021.05); C12Q 1/6876 (2021.05)

(21)(22) Заявка: 2021103867, 16.02.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.02.2021Дата регистрации:
12.08.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 16.02.2021

(45) Опубликовано: 12.08.2021 Бюл. № 23

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

Чурносов Михаил Иванович (RU),
Свинарева Дина Ильсуровна (RU),
Елькова Анна Владимировна (RU),
Рудых Наталья Александровна (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 2558861 C1, 10.08.2015. RU
2592205 C1, 20.07.2016. RU 2580306 C1,
10.04.2016. RU 2598878 C1, 27.09.2016. WO
2011004404 A1, 13.01.2011. СВИНАРЕВА Д.И.
Вклад ген-генных взаимодействий
полиморфных локусов матриксных
металлопротеиназ в подверженность к
первичной открытоугольной глаукоме у
мужчин. Научные результаты
биомедицинских исследований. 12 (см. прод.)

(54) Способ прогнозирования риска развития первичной открытоугольной глаукомы у женщин по генетическим данным

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и предназначено для прогнозирования риска развития первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ) у неродственных русских пациенток, уроженок Центрально-Черноземного региона РФ. Из периферической венозной крови выделяют ДНК. Проводят анализ генетических маркеров матриксных металлопротеиназ. Прогнозируют

высокий риск развития ПОУГ у женщин в случае выявления гаплотипа GG по локусам rs2250889 и rs17577 гена MMP9. Изобретение обеспечивает получение критериев оценки риска развития ПОУГ у неродственных женщин русской национальности, уроженок Центрально-Черноземного региона РФ. 2 ил., 2 пр.

(56) (продолжение):

января 2020; 6 (1): 63-77.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G01N 33/49 (2006.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G01N 33/49 (2021.05); G01N 33/58 (2021.05); C12Q 1/6806 (2021.05); C12Q 1/6876 (2021.05)

(21)(22) Application: **2021103867, 16.02.2021**

(24) Effective date for property rights:
16.02.2021

Registration date:
12.08.2021

Priority:

(22) Date of filing: **16.02.2021**

(45) Date of publication: **12.08.2021** Bull. № 23

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

**Churnosov Mikhail Ivanovich (RU),
Svinareva Dina Ilurovna (RU),
Elykova Anna Vladimirovna (RU),
Rudykh Natalya Aleksandrovna (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 RISK OF DEVELOPING PRIMARY OPEN-ANGLE GLAUCOMA IN WOMEN ACCORDING TO GENETIC DATA**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine and is intended to predict the risk of developing primary open-angle glaucoma (POAG) in unrelated Russian patients, a native of the Central Black Earth region of the Russian Federation. DNA is isolated from the peripheral venous blood. Analysis of genetic markers of matrix metalloproteinases is carried out. A high risk of

developing POAG in women is predicted if the GG haplotype is detected at the rs2250889 and rs17577 loci of the MMP9 gene.

EFFECT: invention provides criteria for assessing the risk of POAG development in unrelated women of Russian nationality, natives of the Central Black Earth region of the Russian Federation.

1 cl, 2 dwg, 2 ex

RU 2 753 270 C1

RU 2 753 270 C1

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 [A metabolomics profiling of glaucoma points to mitochondrial dysfunction, enescence, and polyamines deficiency [Text] / S. Leruez, A. Marill, T. Bresson [et al.] *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2018. – Vol. 59, № 11. – P. 4355-4361]. Среди клинических форм заболевания наиболее распространенной является первичная открыто-угольная глаукома (ПОУГ), на долю которой приходится от 72,3 до 96,1% всех форм глауком [MicroRNA-related polymorphisms in pseudoexfoliation syndrome, pseudoexfoliative glaucoma, and primary open-angle glaucoma [Text] / A. Chatzikiyriakidou, P. Founti, A. Melidou [et al.] // *Ophthalmic. Genet.* – 2018. – Vol. 39, № 5. – P. 603-609]. В мире от глаукомы страдает более 90 млн. человек, а к 2030 году ожидается увеличение числа таких больных в 2 раза [Биохимические и структурно-биомеханические особенности матрикса склеры человека при первичной открытоугольной глаукоме [Текст] / Е. Н. Иомдина, Н. Ю. Игнатъева, Н. А. Данилов [и др.] // *Вестник офтальмологии.* – 2011. – Т. 127, № 6. – С. 10-14]. В России по некоторым данным насчитывается 750 тыс. больных глаукомой [Нарушение сосудисто-тромбоцитарного гемостаза как фактор риска прогрессирования первичной открытоугольной глаукомы [Текст] / Н. И. Курышева, В. Н. Трубилин, Е. Ю. Иртегова [и др.] // *Офтальмология.* – 2015. – Т. 12, № 3. – С. 54-62].

ПОУГ – хроническое заболевание, которое характеризуется оптической нейропатией, прогрессирующей дегенерацией ганглиозных клеток и слоя нервных волокон сетчатки [Биохимические и структурно-биомеханические особенности матрикса склеры человека при первичной открытоугольной глаукоме [Текст] / Е. Н. Иомдина, Н. Ю. Игнатъева, Н. А. Данилов [и др.] // *Вестник офтальмологии.* – 2011. – Т. 127, № 6. – С. 10-14].

Особенностью ПОУГ является бессимптомное течение и довольно сложная и трудоемкая диагностика на начальных стадиях, поэтому выявление данного заболевания в большинстве случаев происходит на стадиях, сопровождающихся уже необратимыми изменениями зрительного нерва [Krzyżanowska-Berkowska, P. Relationship between the rate of change in lamina cribrosa depth and the rate of retinal nerve fiber layer thinning following glaucoma surgery [Electronic resource] / P. Krzyżanowska-Berkowska, K. Czajor, I. Helemejko [et al.] // *PLoS One.* – 2018. – Vol. 13, № 11. – Art. ID 0206040. – Mode of access: <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0206040&type=printable>].

Потерянное в результате болезни зрение не восстанавливается. Несмотря на достигнутые успехи в лечении, более половины больных продолжают терять зрительные функции даже после хирургического и лазерного лечения. Это заболевание – одно из главных причин слабovidения и слепоты среди лиц трудоспособного возраста в развитых странах [Blood pressure, ocular perfusion pressure and open-angle glaucoma in patients with systemic hypertension [Text] / E. Cantor, F. Méndez, C. Rivera [et al.] // *Clin. Ophthalmol.* – 2018. – Vol. 12. – P. 1511-1517]. На сегодняшний день нет однозначной теории этиопатогенеза глаукомного процесса при ПОУГ с пониманием причин и последовательности развития глаукоматозного процесса в целом, при этом важное значение в развитии ПОУГ имеют матриксные металлопротеиназы (далее ММП).

Семейство матриксных металлопротеиназ представляет собой семейство цинк- и кальций-зависимых эндопептидаз и состоит из более чем 20 энзимов, которые способны расщеплять почти все компоненты экстрацеллюлярного матрикса соединительной ткани. ММП служат основными регуляторами состава внеклеточного матрикса.

Основной биологической функцией ММП является удаление компонентов внеклеточного матрикса. Металлопротеазы регулируют действие факторов роста:

сосудистого эндотелиального фактора, рецептора фактора роста фибробластов, эпителиального и инсулиноподобного фактора роста (Sawicki G., 2005). MMP-2, -3, -7, -9 способствуют активации трансформирующего фактора роста β , являющегося хемоаттрактантом для моноцитов, высвобождая его из матрикса [Потеряева, О. Н.

5 Матриксные металлопротеиназы: строение, регуляция, роль в развитии патологических состояний [Электронный ресурс] : обзор литературы / О. Н. Потеряева // Медицина и образование в Сибири. – 2010. – № 5. – Ст. 2. – Режим доступа: <http://ngmu.ru/cozo/mos/article/pdf.php?id=449>. MMP играют центральную роль в обмене белков соединительной
10 ткани, процессах нормального развития внеклеточного матрикса, при онкогенезе и ангиогенезе [Ганусевич, И. И. Роль матриксных металлопротеиназ (ММП) при злокачественных новообразованиях. I. Характеристика ММП, регуляция их активности, прогностическое значение [Текст] : обзор / И. И. Ганусевич // Онкология : прил. к журн. «Экспериментальная онкология». – 2010. – Т. 12, № 1. – С. 10-16].

15 Матриксная металлопротеиназа-9 (MMP-9, желатиназа В) вовлечена в воспалительные процессы, играет значимую роль в ремоделировании и репарации тканей, определяет мобилизацию различных факторов роста и цитокиновых факторов. В регуляции биологической активности MMP-9 участвуют различные цитокины и факторы роста, в том числе фактор роста фибробластов, эпидермальный фактор роста, тромбоцитарный фактор роста, трансформирующий фактор роста β , фактор роста сосуда эндотелия,
20 фактор роста нервов, фактор некроза опухоли α , интерлейкины, интерфероны и др. Согласно литературным данным MMP-9 принимает участие в разрушении белков внеклеточного матрикса, активирует факторы роста (TGF- β и TNF- α) [Oliveras, A. Resistant hypertension: patient characteristics, risk factors, comorbidities and outcomes [Text] / A. Oliveras, A. de la Sierra // J. Hum. Hypertens. – 2014. – Vol. 28, № 4. – P. 213-217].

25 В Российской Федерации исследования вовлеченности генов матриксных металлопротеиназ в формирование предрасположенности к ПОУГ и ее осложнений у женщин единичны и фрагментарны, а данные о роли генетических вариантов rs2250889 и rs17577 MMP-9 в развитии ПОУГ у женщин отсутствуют.

30 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 первичной открытоугольной глаукомы у женщин на основе молекулярно-генетических данных в зависимости от полиморфных маркеров генов матриксных металлопротеиназ. Источники информации: сайты Федерального института промышленной собственности <http://fips.ru>.

35 В изученной научно-медицинской и доступной патентной литературе авторами не было обнаружено способа прогнозирования риска развития ПОУГ у женщин на основе данных о гаплотипе GG генетических полиморфизмов rs2250889 и rs17577 гена MMP-9.

40 Известен способ прогнозирования риска развития и прогрессирования глаукомы по патенту РФ №2354287 (опубликован 10.05.2009), в котором определяют корнеальный гистерезис и центральную толщину роговицы и затем по формуле рассчитывают биомеханический коэффициент роговицы: $K=КГ/ЦТР \cdot 50$, где К - биомеханический коэффициент роговицы, КГ - корнеальный гистерезис, ЦТР - центральная толщина роговицы, и при значении менее 0,82 прогнозируют риск развития и прогрессирования
45 глаукомы. Способ обеспечивает адекватное прогнозирование риска развития и прогрессирования глаукомы с учетом эластических свойств роговицы и ее центральной толщины и проведение соответствующего лечения. К недостаткам данного способа относится то, что он не учитывает роль генетических полиморфизмов и, кроме того,

предусматривает необходимость наличия дорогостоящего офтальмологического оборудования: анализатор биомеханических свойств глаза и пахиметр.

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 (ММР-9/ТИМР-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 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 двух биологических проб: слезной жидкости и сыворотки крови.

Патент РФ №2517233, опубликован 27.05.2014, описывает способ прогнозирования прогрессирования первичной открытоугольной глаукомы, заключающийся в том, что отбирают пробы слезной жидкости и крови, затем в слезной жидкости и сыворотке крови определяют содержание антиапоптотического белка Bcl-2. При отсутствии его в слезной жидкости и/или сыворотке прогнозируют прогрессирование глаукоматозного процесса. Способ позволяет прогнозировать прогрессирование глаукоматозного процесса с дальнейшим проведением соответствующих адекватных лечебных мероприятий. Недостатком является трудоемкость исследования, т.к. необходимо исследовать сразу два биологических материала, а так же, что он не учитывает роль генетических полиморфизмов.

За прототип выбран патент РФ № 2558861 по заявке № 2014132597/15 от 07.08.2014 «Способ прогнозирования риска развития первичной открытоугольной глаукомы». В ходе данного исследования методом дискриминантного анализа (далее ЛДФ) проведено изучение больных ПОУГ и контрольной группы по десяти предикторам: возраст, наличие сердечно-сосудистых заболеваний, уровень систолического артериального давления, уровень диастолического артериального давления, наличие ПОУГ среди родственников, наличие сопутствующей патологии глаз, микрососудистые нарушения в переднем отрезке глаз, состояние пигментной каймы зрачкового края радужной оболочки, степень пигментации угла передней камеры, генетический вариант по локусу+1663A/G TNFR2. Материалом для исследования служила венозная кровь, выделение геномной ДНК проводилось методом фенольнохлороформной экстракции. Типирование локуса+1663A/G TNFR2 проводилось с помощью полимеразной цепной реакции синтеза ДНК на амплификаторе IQ5 (Bio-Rad) в режиме real time. Недостатком прототипа является то, что не учитывается влияние на развитие ПОУГ других генетических полиморфизмов и их сочетаний а также половая принадлежность.

Задачей настоящего исследования является расширение арсенала методов диагностики, а именно создание способа прогнозирования риска развития ПОУГ у женщин на основе данных о гаплотипе GG полиморфных локусов rs2250889-rs17577 гена ММР 9.

Технический результат использования изобретения – получение критериев оценки риска развития ПОУГ у неродственных женщин русской национальности, уроженок Центрально – Черноземного региона РФ (из Белгородской, Курской, Воронежской, Тамбовской и Липецкой областей), на основе данных о полиморфных локусах rs2250889 и rs17577 гена MMR 9, включающий:

- выделение ДНК из периферической венозной крови;
- анализ полиморфизмов rs2250889 и rs17577 гена MMR 9;
- прогнозирование высокого риска развития ПОУГ у женщин при выявлении гаплотипа GG генетических полиморфизмов rs2250889 и rs17577 гена MMR-9.

Новизна и изобретательский уровень заключаются в том, что из уровня техники не известна возможность прогноза развития ПОУГ у женщин на основе данных о гаплотипе GG полиморфных локусов rs2250889-rs17577 гена MMR 9.

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, ресуспензируют. 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 -20⁰С.

Анализ полиморфных маркеров rs2250889 и rs17577 гена MMR-9 осуществляется методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на термоциклере CFX-96 Real-Time System (Bio-Rad) с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров и зондов [Elevated MMR-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)).

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

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

Изобретение характеризуется фигурами:

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 rs2250889 MMR-9, ■ - GG, ● - CC, ▲ - CG, ◆ - отрицательный контроль.

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 rs17577 MMR-9, ■ - GG, ● - AA, ▲ - GA, ◆ - отрицательный контроль.

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

Возможность использования предложенного способа для оценки прогнозирования риска развития ПОУГ у женщин подтверждает анализ результатов наблюдений 510 пациенток, из которых 290 больных с первичной открытоугольной глаукомой и 220 женщин контрольной группы (ПОУГ отсутствовала). Среди больных средний возраст – $70,93 \pm 8,70$ лет, в контрольной группе средний возраст – $62,02 \pm 11,54$ лет. Изучаемые группы включали неродственных русских пациенток, уроженок Центрально-Черноземного региона РФ (из Белгородской, Курской, Воронежской, Тамбовской и Липецкой областей). В группу больных были включены женщины с диагнозом ПОУГ, подтвержденного необходимыми методами исследования в клинических условиях. Для диагностики глаукомы использовались следующие критерии: высокое внутриглазное давление, наличие глаукоматозной экскавации диска зрительного нерва и характерных изменений периферического поля зрения. Больные обследовались на базе офтальмологического центра «Поколение» г. Старый Оскол, отделения офтальмологии областной клинической больницы им. Святителя Иоасафа г. Белгорода, медицинского центра микрохирургии глаза «Ковчег» г. Белгорода. Все необходимые процедуры по осмотру и обследованию больных и индивидуумов контрольной группы проводились с их информированного согласия. Исследование проводилось под контролем этического комитета медицинского института НИУ «БелГУ».

Типирование молекулярно-генетических маркеров осуществлялось 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 ПОУГ у женщин установлена связь с формированием заболевания гаплотипа GG полиморфных локусов rs2250889 и rs17577 гена MMR9. Гаплотип GG rs2250889-rs17577 является фактором риска развития ПОУГ у женщин ($OR=1,80$; $p=0,009$).

В качестве примеров конкретного применения разработанного способа приведено обследование русских пациенток, уроженок Центрально-Черноземного региона РФ (из Белгородской, Курской, Воронежской, Тамбовской и Липецкой областей) и не являющихся родственниками между собой: проведено генетическое обследование по локусам rs2250889 и rs17577 гена MMR9.

Пример 1

У пациентки Р. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров был выявлен гаплотип GG по локусу rs2250889 и rs17577 гена MMR9, что позволило отнести пациентку в группу больных с высоким риском развития ПОУГ. Дальнейшее наблюдение подтвердило диагноз первичной открытоугольной глаукомы у пациентки.

Пример 2

У пациентки С. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров был выявлен гаплотип GA по локусу rs2250889 и rs17577 гена MMR9, что позволило отнести пациентку в группу больных с низким риском развития ПОУГ. Дальнейшее наблюдение не выявило первичной открытоугольной глаукомы у пациентки.

Применение данного способа позволит на доклиническом этапе формировать среди

женщин группы риска и своевременно реализовывать в этих группах необходимые лечебно-профилактические мероприятия по предупреждению развития ПОУГ.

(57) Формула изобретения

5 Способ прогнозирования риска развития первичной открытоугольной глаукомы у
неродственных русских пациенток, уроженок Центрально-Черноземного региона РФ,
включающий выделение ДНК из периферической венозной крови, отличающийся тем,
что проводят анализ генетических маркеров матриксных металлопротеиназ,
прогнозируют высокий риск развития первичной открытоугольной глаукомы у женщин
10 в случае выявления гаплотипа GG по локусам rs2250889 и rs17577 гена MMP9.

15

20

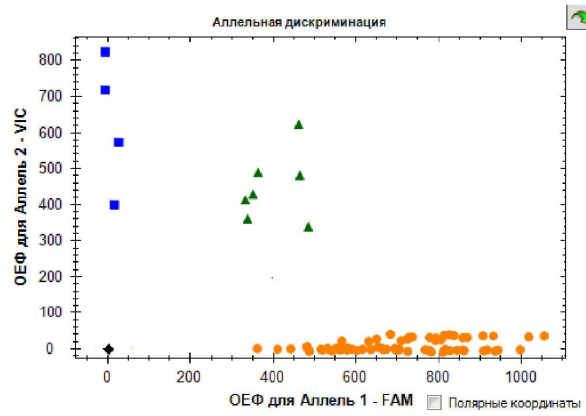
25

30

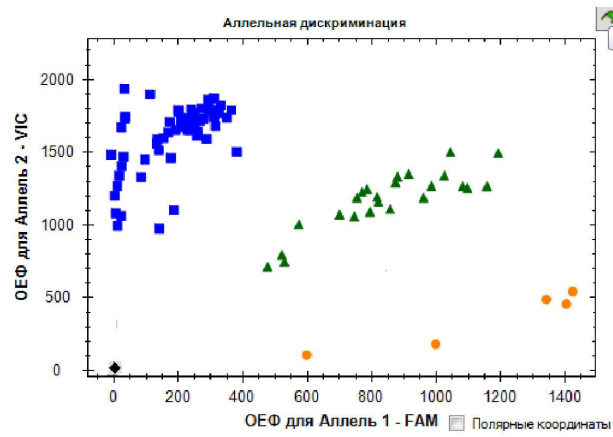
35

40

45



Фиг. 1



Фиг. 2