



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: 2021104010, 17.02.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
17.02.2021Дата регистрации:
12.08.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 17.02.2021

(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),
Елькова Анна Владимировна (RU),
Пономаренко Ирина Васильевна (RU),
Беляева Татьяна Михайловна (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 2585382 C1, 27.05.2016. RU
2574015 C1, 27.01.2016. RU 2572338 C1,
10.01.2016. ДЕНИСОВА Я.Е. и др. Ассоциация
полиморфизма лимфотоксина α (+250 A/G
LТ α) с формированием хронической истинной
экземы. Современные проблемы науки и
образования. 2014; 3. БЕЛЯЕВА Т.М. Роль
взаимодействия полиморфных локусов гена
FLG в формировании хронической истинной
(см. прод.)

(54) Способ прогнозирования риска развития хронической истинной экземы у женщин с учетом генетических факторов

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и предназначено для прогнозирования риска развития хронической истинной экземы (ХИЭ) у неродственных русских пациенток, уроженок Центрально-Черноземного региона РФ. Из периферической венозной крови выделяют ДНК. Проводят анализ генетических маркеров гена филагрина. Выявление гаплотипа АСТGGAT полиморфных локусов rs558269137, rs61816761,

rs3126085 и rs12144049 гена FLG, где АСТG относится к полиморфизму rs558269137, прогнозирует высокий риск развития ХИЭ у женщин. Изобретение обеспечивает получение критериев оценки риска развития ХИЭ у женщин, родившихся и проживающих в Центральном Черноземье России, имеющих русскую национальность и не являющихся родственниками. 4 ил., 2 пр.

(56) (продолжение):

экземы у женщин. Научные результаты биомедицинских исследований. 2019; 5(4): 5-18. БЕЛЯЕВА Т.М. Изучение ассоциаций гаплотипов полиморфизма гена FLG с развитием хронической истинной экземы у мужчин. Научные результаты биомедицинских исследований. 26 мая 2020; 6(2): 160-171. ESPARZA-GORDILLO

R U 2 7 5 3 2 7 4 C 1 4 2 7 4

R U 2 7 5 3 2 7 4 C 1



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: **2021104010, 17.02.2021**

(24) Effective date for property rights:
17.02.2021

Registration date:
12.08.2021

Priority:

(22) Date of filing: **17.02.2021**

(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),
Elykova Anna Vladimirovna (RU),
Ponomarenko Irina Vasilevna (RU),
Belyaeva Tatyana Mikhajlovna (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 CHRONIC TRUE ECZEMA IN WOMEN, TAKING INTO ACCOUNT GENETIC FACTORS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to the field of medicine and is intended to predict the risk of developing chronic true eczema (CTE) 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 the genetic markers of the filaggrin gene is carried out. Identification of the ACTGGAT haplotype of the

polymorphic loci rs558269137, rs61816761, rs3126085 and rs12144049 of the FLG gene, where ACTG refers to the rs558269137 polymorphism, predicts a high risk of developing CTE in women.

EFFECT: invention ensures the receipt of criteria for assessing the risk of developing CTE in women born and living in the Central Black Earth Region of Russia, who have Russian nationality and are not relatives.

1 cl, 4 dwg, 2 ex

C 1
2 7 5 3 2 7 4
R U

R U
2 7 5 3 2 7 4
C 1

Экзема является распространенным хроническим заболеванием, характеризующимся воспалением кожи. От нее, по оценкам ученых, страдают около сорока миллионов человек по всему миру (Plötz S.G., Wiesender M., Todorova A., et al. What is new in atopic dermatitis/eczema? // *Expert Opin. Emerg. Drugs.* 2014;19:441–458), и заболеваемость ею
5 продолжает расти.

С точки зрения общего понятия экзема - это острое или хроническое рецидивирующее воспалительное заболевание кожи, вызываемое различными экзогенными и эндогенными факторами, характеризующееся полиморфной сыпью и зудом (Дерматовенерология. Национальное руководство / под ред. Ю.К. Скрипкина, Ю. С. Бутова, О.Л. Иванова.
10 - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. - 1024 с.).

С клинической точки зрения для экземы, в том числе истинной, присущ особый симптомо-комплекс: серозные колодцы, зуд и эволюционный полиморфизм, которые в свою очередь приводят к обезвоживанию эпидермиса на пораженных участках (Thomsen S.F. Atopic Dermatitis: Natural history, diagnosis, and treatment // *ISRN Allergy.* 2014;
15 2014). Преобладающие в клинической картине острой экземы серозные (экзематозные) колодцы, представляющие собой эрозии на месте вскрывшихся пузырьков и обильно отделяющие серозный экссудат, а также упоминание о их наличии в анамнезе при хронической экземе, можно считать патогномоничным признаком экземы. Благодаря этим симптомам, пациенты с экземой обычно имеют значительное снижение качества
20 жизни, так как в первую очередь испытывают зуд, нарушения сна и снижение психологического благополучия (Solomon I., Ilie M.A., Draghici C., et al. The impact of lifestyle factors on evolution of atopic dermatitis: An alternative approach // *Exp Ther Med.* 2019; 17(2):1078-1084).

Учитывая все вышесказанное, экземе следует считать, как это принято среди
25 российского научного дерматологического сообщества, отдельной нозологией.

Экзема формируется в результате воздействия сложного комплекса этиологических и патогенетических факторов, в том числе нейроэндокринных, метаболических, инфекционно-аллергических, вегето-сосудистых и наследственных (Sehgal V.N., Khurana A., Mendiratta V., et al. Atopic Dermatitis; Etio-Pathogenesis, An Overview // *Indian J Dermatol.*
30 2015;60(4):327-331).

Заболевание вызывается многообразным и многогранным рядом экзогенных триггерных факторов: (бактериальными, грибковыми и вирусными инфекционными агентами, химическими и биологическими веществами, физическими факторами, лекарственными средствами и медикаментами, пищевыми продуктами, косметическими
35 средствами и др.) и эндогенных факторов (генетической предрасположенностью, патологией иммунной системы, наличием сенсibilизации к различным аллергенам, наличием инфекционных и неинфекционных заболеваний, антигенными свойствами микроорганизмов из очагов хронической инфекции, гиперреактивностью кожи) (Park K.D., Pak S.C., Park K.K. The Pathogenetic Effect of Natural and Bacterial Toxins on Atopic
40 Dermatitis // *Toxins (Basel).* 2016;9(1):3).

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
45 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 (рисунок 2) 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 (McAlear 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.

5 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 10 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 15 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 20 формирование предрасположенности к хронической истинной экземе и ее осложнений у женщин единичны и фрагментарны, а данные о роли генетических вариантов rs558269137, rs61816761, rs3126085 и rs12144049 FLG в развитии ХИЭ у женщин отсутствуют.

Для оценки сложившейся патентной ситуации был выполнен поиск по охраняемым документам за период с 1990 по 2020 гг. Анализ документов производился по 25 направлению: способ прогнозирования риска развития хронической истинной экземы у женщин на основе молекулярно-генетических данных в зависимости от полиморфных маркеров гена филаггрина. Источники информации: сайты Федерального института промышленной собственности <http://fips.ru>.

30 В изученной научно-медицинской и доступной патентной литературе авторами не было обнаружено способа прогнозирования риска развития ХИЭ у женщин на основе данных о гаплотипе WGAT генетических полиморфизмов rs558269137, rs61816761, rs3126085 и rs12144049 гена FLG.

Известен способ прогнозирования риска раннего развития профессиональных 35 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 40 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 45 хемилюминесцентного сигнала, далее проводят сравнение полученной нуклеотидной последовательности в положении 4889 с референсными последовательностями, при выявлении на полученной пирограмме отсутствия замены аденина на гуанин и при воздействии на организм вредного производственного фактора раздражающего и сенсibilизирующего действия прогнозируют риск раннего развития профессиональных

аллергических дерматозов менее 40%, при выявлении на полученной пирограмме гетерозиготного варианта Cур1A1*2С, обусловленного заменой аденина на гуанин в нуклеотидной последовательности в положении 4889, и при воздействии на организм вредного производственного фактора раздражающего и сенсибилизирующего 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 так же 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 Lta,+1663A/G TNFR2 и их сочетаний. Повышенный риск развития среднетяжелого течения хронической истинной экземы прогнозируют при наличии аллеля +250G Lta или сочетании аллеля+250G Lta с аллелем +1663G TNFR2, или сочетании аллеля -308A TNFα с аллелем +1663G TNFR2, или сочетании аллеля -308G TNFα с аллелем+250G Lta. Прогнозируют пониженный риск развития среднетяжелого течения ХИЭ при сочетании аллеля -308G TNFα с генотипом +250AA Lta. Однако известный способ оценивает только генетический риск развития хронической истинной экземы, поскольку исследуются гены рецепторной системы фактора некроза опухоли, отражающие события апоптоза, а что 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 Lta [Ассоциация полиморфизма лимфотоксина α (+250 A/G Lta) 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 у женщин.

5 Задачей настоящего исследования является расширение арсенала методов диагностики, а именно создание способа прогнозирования риска развития ХИЭ у женщин на основе данных о полиморфных локусах rs558269137, rs61816761, rs3126085 и rs12144049 гена FLG.

10 Технический результат использования изобретения – получение критериев оценки риска развития ХИЭ у женщин, родившихся и проживающих в Центральном Черноземье России, имеющих русскую национальность и не являющихся родственниками, на основе данных о полиморфных локусах rs558269137, rs61816761, rs3126085 и rs12144049 гена FLG.

Технический результат достигается с помощью заявленного способа, включающего:
 15 - выделение ДНК из периферической венозной крови у женщин, родившихся и проживающих в Центральном Черноземье России, имеющих русскую национальность и не являющихся родственниками;

- анализ полиморфизмов rs558269137, rs61816761, rs3126085 и rs12144049 гена FLG;
 - прогнозирование высокого риска развития ХИЭ у женщин при выявлении гаплотипа АСТGGАТ полиморфных локусов rs558269137, rs61816761, rs3126085 и rs12144049 гена
 20 FLG, где АСТG относится к полиморфизму rs558269137.

Новизна и изобретательский уровень заключаются в том, что из уровня техники не известна возможность прогноза развития ХИЭ у женщин на основе данных о гаплотипе АСТGGАТ полиморфных локусов rs558269137, rs61816761, rs3126085 и rs12144049 гена FLG, где АСТG относится к полиморфизму rs558269137.

25 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-НСl (рН=7,6). Полученную смесь
 30 перемешивают и центрифугируют при 4°С, 4000 об/мин в течение 20 минут. После центрифугирования надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют 4 мл раствора, содержащего 25 мМ ЭДТА (рН=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°С в течение 16 часов.

35 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
 40 растворяют в бидистиллированной, деионизованной воде и хранят при -20°С.

Анализ полиморфных маркеров rs558269137, rs61816761, rs3126085 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
 45 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 ММР – 4 мкл, Taq-полимеразу - 2 мкл, исследуемый образец (~30 нг ДНК/мкл) - 1 мкл, деионизированная вода – 3 мкл.

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:

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 rs558269137

FLG (● - AA, ■ - GG, ▲ - GA, ■ - 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 rs61816761 FLG

(● - AA, ■ - GG, ▲ - GA, ■ - отрицательный контроль).

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 rs3126085 FLG

(● - AA, ■ - GA, ▲ - GG, ■ - отрицательный контроль).

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).

С помощью программы Haploview v.4.2 (<https://www.broadinstitute.org/haploview/haploview>) проведен анализ неравновесия по сцеплению между парами SNPs и построены гаплоглоки. С использованием коэффициента D' , предложенного Левонтином и коэффициента корреляции r^2 Пирсона оценивали неравновесие по сцеплению между рядом расположенными SNPs. В соответствии с алгоритмами «Solid Spine» и «Four gamete frequencies» с заданным порогом $D' > 0,8$ определялась блочная структура. (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).

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 $p_{perm} < 0,05$.

Возможность использования предложенного способа для оценки прогнозирования риска развития ХИЭ у женщин подтверждает анализ результатов наблюдений 453 пациенток, из которых 237 больных с хронической истинной экземой и 216 женщин 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 неродственных русских пациенток, родившихся и проживающих в Центральном Черноземье России. 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 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 расчете частот гаплотипов и анализе их ассоциаций с формированием ХИЭ у женщин установлена связь с формированием заболевания гаплотипа АСТGGAT полиморфных локусов rs558269137, rs61816761, rs3126085 и rs12144049 гена FLG, где АСТG относится к полиморфизму rs558269137, находящихся в неравновесии по сцеплению. Гаплотип АСТGGAT rs558269137, rs61816761, rs3126085 и rs12144049 является фактором риска развития ХИЭ у женщин (OR=1,66; p=0,016).

В качестве примеров конкретного применения разработанного способа приведено обследование русских пациенток, уроженок Центрально-Черноземного региона РФ и не являющихся родственниками между собой: проведено генетическое обследование по локусам rs558269137, rs61816761, rs3126085 и rs12144049 гена FLG.

Пример 1

У пациентки С. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров был выявлен гаплотип АСТGGAT полиморфных локусов rs558269137, rs61816761, rs3126085 и rs12144049 гена FLG, что позволило отнести пациентку в группу больных с высоким риском развития ХИЭ. Дальнейшее наблюдение подтвердило диагноз хронической истинной экземы у пациентки.

Пример 2

У пациентки Р. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров был выявлен гаплотип АСТGGGT по локусу rs558269137, rs61816761, rs3126085 и rs12144049 гена FLG, что позволило отнести пациентку в группу больных с низким риском развития ХИЭ. Дальнейшее наблюдение не выявило у пациентки диагноза хронической истинной экземы.

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 ХИЭ у женщин.

(57) Формула изобретения

Способ прогнозирования риска развития хронической истинной экземы у неродственных русских пациенток, уроженок Центрально-Черноземного региона РФ, включающий выделение ДНК из периферической венозной крови, анализ генетических маркеров гена филаггрина, отличающийся тем, что высокий риск развития хронической истинной экземы у женщин прогнозирует выявление гаплотипа АСТGGAT полиморфных

локусов rs558269137, rs61816761, rs3126085 и rs12144049 гена FLG, где АСТG относится к полиморфизму rs558269137.

5

10

15

20

25

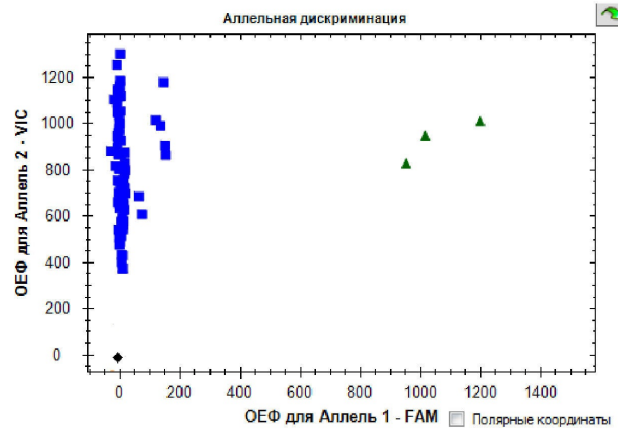
30

35

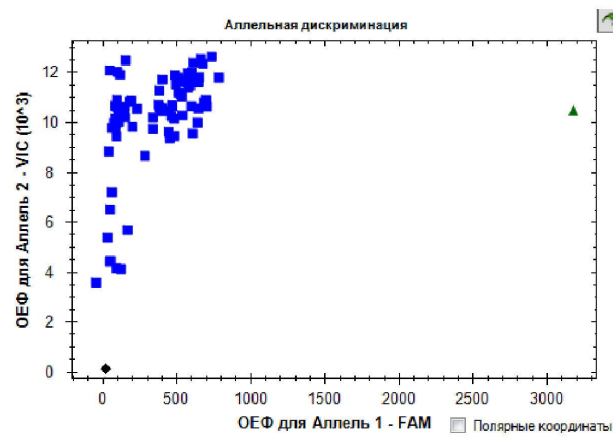
40

45

1

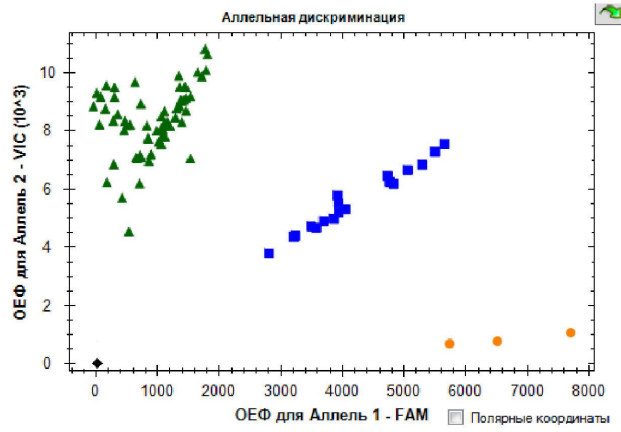


Фиг. 1

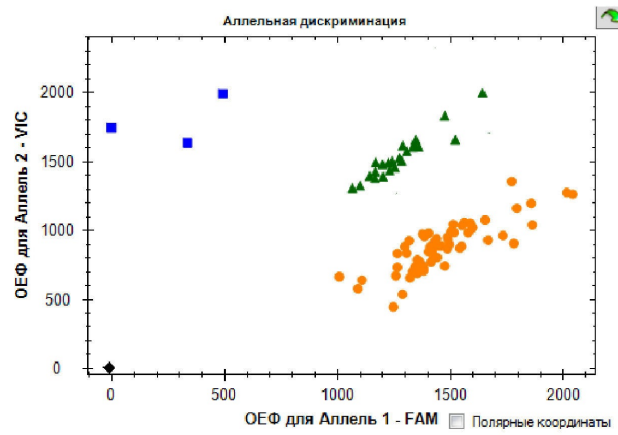


Фиг. 2

2



Фиг. 3



Фиг. 4