



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК
G01N 33/58 (2006.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)
C12Q 1/6827 (2018.01)
C12Q 1/686 (2018.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)
C12Q 1/6883 (2018.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/58 (2023.05); *C12Q 1/6806* (2023.05); *C12Q 1/6827* (2023.05); *C12Q 1/686* (2023.05); *C12Q 1/6876* (2023.05); *C12Q 1/6883* (2023.05)

(21)(22) Заявка: 2023104120, 22.02.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.02.2023Дата регистрации:
03.10.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 22.02.2023

(45) Опубликовано: 03.10.2023 Бюл. № 28

Адрес для переписки:

308015, г. Белгород, ул. Победы, 85, НИУ
"БелГУ", Шевцова Ирина Владимировна

(72) Автор(ы):

Новакова Ольга Николаевна (RU),
Новаков Виталий Борисович (RU),
Пономаренко Ирина Васильевна (RU),
Чурносов Михаил Иванович (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: WO 2008049225 A1, 02.05.2008. JP
2020178585 A, 05.11.2020. НОВАКОВ В.Б. и др.
Полногеномные исследования остеоартроза
коленного сустава: обзор литературы.
Травматология и ортопедия России. 2021;
27(4): 131-144. AUBOURG G. et al. Genetics of
osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage. 2022 May;
30(5): 636-649. Epub 2021 Mar 17. GEE F. et al.
Allelic (см. прод.)

(54) Способ прогнозирования риска развития остеоартроза коленного сустава с учетом генетических маркеров

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к медицинской диагностике, и может быть использовано для прогнозирования риска развития остеоартроза коленного сустава с учетом генетических маркеров у населения русской национальности Центрального Черноземья России. Из лейкоцитов периферической венозной крови выделяют ДНК. Проводят анализ полиморфных локусов rs34195470 гена WWP2 и rs6976 гена GLT8D1. При выявлении комбинации генотипов AG rs34195470

гена WWP2 и CC rs6976 гена GLT8D1 прогнозируют высокий риск развития остеоартроза коленного сустава. Способ обеспечивает получение новых критериев оценки риска развития остеоартроза коленного сустава у лиц русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья России, на основе данных о межлокусном взаимодействии полиморфных вариантов rs34195470 гена WWP2 и rs6976 гена GLT8D1. 2 ил., 3 пр.

(56) (продолжение):

expression analysis of the osteoarthritis susceptibility locus that maps to chromosome 3p21 reveals cis-acting eQTLs at GNL3 and SPCS1. BMC Med Genet. 2014; 15: 53.

R U 2 8 0 4 6 9 3 C 1

R U 2 8 0 4 6 9 3 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G01N 33/58 (2006.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)
C12Q 1/6827 (2018.01)
C12Q 1/686 (2018.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)
C12Q 1/6883 (2018.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G01N 33/58 (2023.05); *C12Q 1/6806* (2023.05); *C12Q 1/6827* (2023.05); *C12Q 1/686* (2023.05); *C12Q 1/6876* (2023.05); *C12Q 1/6883* (2023.05)

(21)(22) Application: **2023104120, 22.02.2023**

(24) Effective date for property rights:
22.02.2023

Registration date:
03.10.2023

Priority:

(22) Date of filing: **22.02.2023**

(45) Date of publication: **03.10.2023** Bull. № 28

Mail address:

**308015, g. Belgorod, ul. Pobedy, 85, NIU "BelGU",
Shevtsova Irina Vladimirovna**

(72) Inventor(s):

**Novakova Olga Nikolaevna (RU),
Novakov Vitalii Borisovich (RU),
Ponomarenko Irina Vasilevna (RU),
Churnosov Mikhail Ivanovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniia "Belgorodskii gosudarstvennyi
natsionalnyi issledovatel'skii universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**

(54) **METHOD OF PREDICTING THE RISK OF OSTEOARTHRITIS OF THE KNEE JOINT BASED ON GENETIC MARKERS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; medical diagnostics.

SUBSTANCE: invention can be used to predict the risk of developing osteoarthritis of the knee joint in women of Russian nationality, who are natives of the Central Black Earth Region of Russia. DNA is isolated from peripheral venous blood lymphocytes. The polymorphic loci rs34195470 of WWP2 gene and rs6976 of GLT8D1 gene are analyzed. When a combination of AG rs34195470 genotypes of the WWP2 gene and CC rs6976 of the GLT8D1 gene is

detected, a high risk of development of osteoarthritis of the knee joint is predicted.

EFFECT: obtaining new criteria for assessing the risk of development of osteoarthritis of the knee joint in Russians being natives of the Central Chernozem Region of Russia, based on data on interlocus interaction of polymorphic variants rs34195470 of WWP2 gene and rs6976 of GLT8D1 gene.

1 cl, 2 dwg, 3 ex

RU 2 804 693 C1

RU 2 804 693 C1

Изобретение относится к области медицинской диагностики и может быть использовано для прогнозирования риска развития остеоартроза коленного сустава у населения русской национальности Центрального Черноземья России.

Среди заболеваний опорно-двигательной системы одну из самых актуальных проблем по своей медицинской, социальной и экономической значимости представляет собой, несомненно, гонартроз или остеоартроз (ОА) коленного сустава [Кочергин П.Г., Корнилов Н.Н., Куляба Т.А. Влияние компьютерной навигации на клинические и рентгенологические результаты корригирующих околоуставных остеотомий бедренной и большеберцовой костей у больных гонартрозом (обзор литературы). Травматология и ортопедия России. 2017;23(1):163-175]. Распространенность ОА во всем мире составляет около 6,43 % и сильно коррелирует с возрастом пациентов [Jämsen E., Jäntti P., Puolakka T., Eskelinen A. Primary knee replacement for primary osteoarthritis in the aged: gender differences in epidemiology and preoperative clinical state. *Aging. Clin. Exp. Res.* 2012;10(9):135-137]. В Российской Федерации по данным официальной статистики распространенность ОА равна приблизительно 13%, причём у лиц женского пола заболевание встречается чаще, чем у мужчин [Galushko E.A., Nasonov E.L. The prevalence of rheumatic diseases in Russia. *Almanac of clinical medicine.* 2018;1(46):32-39]. По влиянию на состояние здоровья ОА занимает среди всех заболеваний 4-е место у женщин и 8-е у мужчин. При остеоартрозе коленного сустава снижение качества жизни отмечают до 80% пациентов, а инвалидизация составляет от 10 до 21% наблюдений [Матвеев Р.П., Брагина С.В. Остеоартроз коленного сустава: проблемы и социальная значимость. *Экология человека.* 2012;9:53-62]. ОА коленного сустава широко распространен среди средних возрастных групп, активно занимающихся трудовой деятельностью и спортом [Кочергин П.Г., Корнилов Н.Н., Куляба Т.А. Влияние компьютерной навигации на клинические и рентгенологические результаты корригирующих околоуставных остеотомий бедренной и большеберцовой костей у больных гонартрозом (обзор литературы). Травматология и ортопедия России. 2017;23(1):163-175]. Утрата трудоспособности у больных ОА коленного сустава пожилого возраста сравнима с таковой у страдающих сердечно-сосудистыми заболеваниями и выше, чем при других заболеваниях у этого контингента пациентов. Следует также отметить, что ОА является одной из главных причин тотального эндопротезирования коленного сустава, требующего значительных материальных затрат как со стороны пациента, так и государства [Jämsen E., Jäntti P., Puolakka T. et al. Primary knee replacement for primary osteoarthritis in the aged: gender differences in epidemiology and preoperative clinical state. *Aging. Clin. Exp. Res.* 2012;10(9):135-137].

Механизмы развития ОА коленного сустава широко изучаются во всем мире [Лисицина Е.М., Лисицин М.П., Заркмук А.М. Современный подход к патогенезу, диагностике и лечению остеоартроза коленного сустава. *Эндоскопическая хирургия.* 2016;6:57-67]. Возникновение, развитие и прогрессирование патологических процессов, происходящих при ОА, определяется многими факторами, среди них принято выделять экзогенные (чрезмерная механическая нагрузка, ожирение и т.д.) и эндогенные (пол, возраст, генетические факторы) [Pereira D., Ramos E. Branco J. Osteoarthritis. *Acta Med. Port.* 2015;28(1):99-106]. Несомненна роль наследственной предрасположенности как основополагающего фактора риска развития ОА коленного сустава. Согласно литературным данным, вклад генетических детерминант в формирование данного заболевания составляет более 50% [Aubourg G., Rice S.J., Bruce-Wootton P., Loughlin J. Genetics of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2022;30(5):636-649]. Многими научными

коллективами изучается вклад различных групп генов-кандидатов, биологические продукты которых вовлечены в патогенез данного заболевания. Среди кандидатных генов ОА выделяют гены, кодирующие белки матрикса соединительной ткани: гены II, VI, IX подтипов коллагена (COL) и хрящевого тромбоспондина (COMP), матриксных металлопротеиназ (ММР), гены MATN3 и ACAN, кодирующие, матриллин и агрекан соответственно, ген фактора роста и дифференциации 5 (GDF5), ген DVWA, кодирующий белок межклеточного матрикса, взаимодействующий с тубулином и выполняющий связывающие функции, ген SMAD3, регулирующий деятельность TGF- β и т.д. Широко проводятся репликативные исследования однонуклеотидных полиморфных вариантов различных генов, показавших значимые ассоциации с ОА [Шаповалова Д.А., Тюрин А.В., Литвинов С.С. и др. Роль полиморфного локуса VNTR гена агрекана в развитии остеоартроза у женщин, Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(7):865-872]. Среди работ такого плана особое место занимают репликативные исследования GWAS-значимых полиморфных локусов, ассоциированных с ОА коленного сустава [Dai J., Ying P., Shi D. et al. FTO variant is not associated with osteoarthritis in the Chinese Han population: replication study for a genome-wide association study identified risk loci J. Orthop. Surg. Res. 2018;13(1):65]. Репликативные исследования ОА, проведённые в разных популяциях, подтвердили ассоциации с заболеванием лишь единичных полиморфных локусов [Liu Y., Yau M.S., Yerges-Armstrong L.M. et al. Genetic Determinants of Radiographic Knee Osteoarthritis in African Americans. J. Rheumatol. 2017;44(11):1652-1658]. Однако, стоит отметить, что имеющиеся молекулярно-генетические исследования не дают однозначного ответа о роли конкретных GWAS-значимых полиморфных локусов в формировании ОА коленного сустава, что обуславливает актуальность поиска новых генетических маркеров для ранней диагностики данного заболевания.

Согласно каталогу полногеномных исследований (GWAS) полиморфный локус rs6976 гена GLT8D1 показал статистически значимые ассоциации ($p \leq 5 \times 10^{-08}$) с развитием ОА в трёх GWAS-исследованиях (на момент обращения – декабрь 2022 года). Установлено, что аллель T исследуемого полиморфного маркера является фактором риска развития ОА тазобедренного сустава у европейцев в двух GWAS исследованиях ($p = 4,5 \times 10^{-08}$ и $p = 3,1 \times 10^{-11}$ соответственно) [Styrkarsdottir U., Lund S.H., Thorleifsson G. et al. Meta-analysis of Icelandic and UK data sets identifies missense variants in SMO, IL11, COL11A1 and 13 more new loci associated with osteoarthritis. Nat Genet. 2018;50(12):1681-1687; Tachmazidou I., Hatzikotoulas K., Southam L., Esparza-Gordillo J. et al. Identification of new therapeutic targets for osteoarthritis through genome-wide analyses of UK Biobank data. Nat Genet. 2019;51(2):230-236]. В работе E. Zeggini et al. (2012) также установлена рискованная роль аллельного варианта T rs6976 гена GLT8D1 в развитии ОА ($p = 6,56 \times 10^{-09}$) [Zeggini E., Hatzikotoulas K., Tachmazidou I. et al. Genome-wide analyses using UK Biobank data provide insights into the genetic architecture of osteoarthritis. Nat. Genet. 2018;50(4):549-558].

Связь с ОА коленного сустава на полногеномном уровне rs34195470 гена WWP2 показана в двух GWAS-исследованиях (на момент обращения – декабрь 2022 года). В работе U. Styrkarsdottir et al. (2018) выявлена ассоциация аллеля G с данным заболеванием ($p = 2,7 \times 10^{-11}$), причём этот аллельный вариант имеет «рисковую» роль в развитии ОА [Styrkarsdottir U., Lund S.H., Thorleifsson G. et al. Meta-analysis of Icelandic and UK data sets identifies missense variants in SMO, IL11, COL11A1 and 13 more new loci associated with osteoarthritis. Nat Genet. 2018;50(12):1681-1687. В другом GWAS-исследовании показана «протективная роль» противоположного аллеля A rs34195470 гена WWP2 при развитии

ОА коленного сустава ($p=3,1 \times 10^{-13}$) [Boer C.G., Hatzikotoulas K., Southam L. et al. Deciphering osteoarthritis genetics across 826,690 individuals from 9 populations. Cell. 2021;184 (18):4784-4818.e17].

В изученной научно-медицинской и доступной патентной литературе авторами не было обнаружено способа прогнозирования риска развития остеоартроза коленного сустава у населения русской национальности на основе данных о межлокусном взаимодействии полиморфных вариантов rs34195470 гена WWP2 и rs6976 гена GLT8D1.

Известен патент № 2558990 (опубл. 10.08.2015), в котором описан Способ прогнозирования риска возникновения остеоартроза у лиц с гипермобильностью суставов. Данный способ основан на определении объема движений в суставах кистей (при проведении 9 тестов). Дополнительно выявляют из анамнеза жизни возраст дебюта суставных болей и определяют наличие симптома «щелкающего» бедра (чувство щелчка в тазобедренном суставе, систематически возникающее при вставании, ходьбе или вращательных движениях ног). Далее определяют процент риска развития остеоартроза (высокий, средний, низкий риск) у лиц с гипермобильностью суставов. При наличии у лиц с гипермобильностью суставов дебюта суставных болей в возрасте до 38 лет и четырех и более выполненных тестов на объем движений в суставах кистей риск развития остеоартроза составляет 100%. У лиц с гипермобильностью суставов, дебютом суставных болей в возрасте 38 лет и более, наличием двух и более выполненных тестов на объем движений в суставах кистей риск развития остеоартроза составляет 69,6%. У лиц с гипермобильностью суставов, дебютом суставных болей в возрасте 38 лет и более, выполнением менее двух тестов на объем движений в суставах кистей и наличием симптома «щелкающего» бедра риск развития остеоартроза составляет 25%. У лиц с гипермобильностью суставов, дебютом суставных болей в возрасте 38 лет и более, выполнением менее двух тестов на объем движений в суставах кистей при отсутствии симптома «щелкающего» бедра риск развития остеоартроза составляет 0%. Существенными недостатками данного способа являются: 1) Большое число включаемых параметров, что определяет низкую воспроизводимость предложенного способа, а также сложность в проведении большого числа требуемых манипуляций; 2) Данный способ не предусматривает включение в расчет оценки риска развития ОА генетических маркеров, вклад которых в формирование заболевания более 50%.

В патенте RU №2770004 (опубл. 14.04.2022) описан Способ прогнозирования предрасположенности к посттравматическому гонартрозу. Способ характеризуется тем, что проводят генотипирование полиморфизма rs5743708, G2258A (Arg753Gln) гена TLR2 путем выделения геномной ДНК из периферической крови, проводят повторяющиеся циклы полимеразной цепной реакции (ПЦР), каждый из которых включает денатурацию ДНК-матрицы, отжиг праймеров и элонгацию ДНК при заданных температурах с последующим разделением продуктов ПЦР (ампликонов) посредством электрофореза в агарозном геле. Если при генотипировании полиморфного локуса rs5743708 гена TLR2 (Toll-подобного рецептора) выявляют аллель А и генотипы АА и АG данного полиморфизма, то диагностируют высокую генетическую предрасположенность к развитию посттравматического гонартроза. Недостатками метода являются: 1) Возможность прогнозирования только предрасположенности к развитию осложнений после травматического повреждения, а именно к развитию посттравматического ОА коленного сустава; 2) Данный способ информативен только в когорте носителей мутации гена Toll-подобного рецептора TLR2.

Известен патент RU №2600860 (опубл. 27.10.2016), в котором описан Способ прогнозирования предрасположенности к развитию посттравматического остеоартроза

коленного сустава. Данный способ включает выделение ДНК из периферической венозной крови и анализ полиморфизма гена MMP-12 (rs2276109 (A-82G)), при этом при выявлении генотипа GG диагностируют генетическую предрасположенность к развитию посттравматического остеоартроза коленного сустава. Недостатками данного способа являются: 1) Возможность его использования только для определения риска развитию ОА коленного сустава после травмы; 2) При оценке риска развития ОА включают данные только об одном полиморфном локусе, тогда как межлокусные взаимодействия оказывают существенное влияние на риск любой патологии.

Задачей настоящего исследования является расширение арсенала способов диагностики, а именно создание способа прогнозирования риска развития остеоартроза коленного сустава у населения русской национальности Центрального Черноземья России на основе данных о межлокусном взаимодействии полиморфных вариантов rs34195470 гена WWP2 и rs6976 гена GLT8D1.

Технический результат использования изобретения – получение критериев оценки риска развития остеоартроза коленного сустава у лиц русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья России, на основе данных о межлокусном взаимодействии полиморфных вариантов rs34195470 гена WWP2 и rs6976 гена GLT8D1, включающий:

- выделение ДНК из лейкоцитов периферической венозной крови;
- анализ полиморфных локусов rs34195470 гена WWP2 и rs6976 гена GLT8D1;
- прогнозирование высокого риска развития остеоартроза коленного сустава у лиц русской национальности при выявлении комбинации генотипов rs34195470 AG WWP2 x rs6976 CC GLT8D1.

Новизна и изобретательский уровень заключаются в том, что из уровня техники не известна возможность прогноза риска развития остеоартроза коленного сустава у индивидов русской национальности Центрального Черноземья России на основе данных о межлокусном взаимодействии полиморфных вариантов rs34195470 гена WWP2 и rs6976 гена GLT8D1.

Выделение геномной ДНК из периферической крови осуществляют методом фенольно-хлороформной экстракции 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 температуре -20°C. Выделенную ДНК используют для проведения полимеразной цепной реакции синтеза ДНК.

Анализ полиморфных маркеров rs34195470 гена WWP2 и rs6976 гена GLT8D1 осуществлялся методом ПЦР на термоциклере CFX-96 Real-Time System («Bio-Rad», США) с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров и зондов. Амплификация геномной ДНК производилась в реакционной смеси, суммарным объемом

10 мкл, включающей смесь для ПЦР – 4 мкл, Taq-полимеразу – 2 мкл, исследуемый образец (~30 нг ДНК/мкл) - 1 мкл, деионизированная вода - 3мкл.

Генотипирование исследуемых образцов осуществлялось с использованием программного обеспечения «CFX-Manager™» методом дискриминации аллелей по величинам относительных единиц флуоресценции (ОЕФ). Для полиморфизма rs34195470 гена WWP2 зонд с флуоресцентным красителем VIC соответствует аллелю G, зонд с красителем FAM – аллелю A (фиг. 1), для rs6976 гена GLT8D1 зонд с флуоресцентным красителем VIC соответствует аллелю C, зонд с красителем FAM – аллелю T (фиг. 2).

Изобретение характеризуется фигурами.

10 Фиг. 1. Дискриминации аллелей методом детекции TaqMan зондов по данным величин ОЕФ (относительные единицы флуоресценции) каждого зонда на амплификаторе CFX96 с детектирующей системой в режиме реального времени полиморфизма WWP2 (rs34195470): ■-GG, ●-AA, ▲-AG, ◆-отрицательный контроль.

15 Фиг. 2. Дискриминации аллелей методом детекции TaqMan зондов по данным величин ОЕФ (относительные единицы флуоресценции) каждого зонда на амплификаторе CFX96 с детектирующей системой в режиме реального времени полиморфизма GLT8D1 (rs6976): ■-CC, ●-TT, ▲-CT, ◆-отрицательный контроль.

20 Для анализа ассоциации изучаемых полиморфных локусов с риском развития ОА коленного сустава у населения русской национальности проведен расчет показателей отношения шансов (ОШ) и его 95% доверительного интервала (95% ДИ). Вычисления выполнялись методом логистической регрессии в статистическом пакете программы PLINK (электронный ресурс <http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/>) согласно четырех генетических моделей с введение поправок на ковариаты (возраст, пол, индекс массы тела, наследственная отягощённость, наличие заболеваний сердечно-сосудистой, опорно-двигательной, эндокринной систем) и множественные сравнения (применялся адаптивный пермутационный тест). Для изучения межлокусных взаимодействий, ассоциированных с развитием ОА коленного сустава, использовалась модификация метода Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) – MB-MDR. Выполнение MB-MDR проводилось в одноименной программе (версия 2.6) в среде R.

30 Возможность использования предложенного способа для оценки риска развития ОА коленного сустава у населения русской национальности Центрального Черноземья России подтверждает анализ результатов наблюдений 500 больных ОА коленного сустава и 500 индивидов контрольной группы. У всех больных был диагностирован первичный ОА коленного сустава на основе клинического осмотра, лабораторного и рентгенологического исследований согласно Федеральным клиническим рекомендациям по диагностике и лечению остеоартроза. Критерии включения: 1) русская национальность, территория рождения и проживания – Центральное Черноземье России; 2) возраст от 40 лет; 3) диагностированный первичный ОА коленного сустава II-IV стадии по J. Kellgren – J. Lawrence; 4) наличие добровольного информированного согласия на исследование. Критерии исключения: 1) не русская национальность, проживание и/или рождение вне Центрально-Чернозёмного региона России; 2) наличие тяжелых форм артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца, сахарного диабета, почечно-печеночной недостаточности, онкологических заболеваний, системных заболеваний соединительной ткани, травм суставов в анамнезе, воспалительные заболевания суставов, врожденных пороков развития опорно-двигательной системы; 3) отказ от участия в исследовании.

45 Обследование больных ОА коленного сустава проводилось на базе травматологических отделений №1 и №2 ОГБУЗ «Городская больница №2 г. Белгорода»;

формирование контрольной группы (без ОА коленного сустава) проводилось на базе поликлинического отделения №7 г. Белгорода при диспансерном наблюдении.

Все больные ОА коленного сустава и индивиды контрольной группы подписали информированное согласие на участие в исследовании (проведение исследования было одобрено этическим комитетом медицинского института НИУ «БелГУ»).

Типирование молекулярно-генетических маркеров осуществлялось на кафедре медико-биологических дисциплин медицинского института НИУ «БелГУ».

Для анализа ассоциации полиморфных маркеров rs34195470 гена WWP2 и rs6976 гена GLT8D1 с риском развития ОА коленного сустава у лиц русской национальности проведен расчет показателей отношения шансов (ОШ) и его 95% доверительного интервала (95% ДИ). Вычисления выполнялись методом логистической регрессии в статистическом пакете программы PLINK согласно аллельной, аддитивной, рецессивной, доминантной генетических моделей с введением поправок на ковариаты и множественные сравнения (выполнено не менее 1000 пермутационных процедур). В качестве статистически значимого уровня использовали значение $p_{perm} < 0,05$. Для изучения межлокусных взаимодействий, ассоциированных с развитием ОА коленного сустава, использовалась модификация метода Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) – MB-MDR. Выполнение MB-MDR проводилось в одноименной программе (версия 2.6) в среде R.

В ходе исследования установлено, что комбинация генотипов rs34195470 AG WWP2 x rs6976 CC GLT8D1 в рамках эпистатической модели двухлокусного взаимодействия ($\beta=0,40$; $p=0,040$) ассоциирована с высоким риском развития ОА коленного сустава у населения русской национальности Центрального Черноземья России.

В качестве примеров конкретного применения разработанного способа приведено обследование неродственных индивидуумов русской национальности, родившихся и проживающих в Центральном регионе России: выполнено молекулярно-генетическое обследование по локусам rs34195470 гена WWP2 и rs6976 гена GLT8D1.

У пациентки М. была взята периферическая венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров была выявлена комбинация генотипов rs34195470 AG WWP2 x rs6976 CC GLT8D1, что позволило отнести пациентку в группу с высоким риском развития заболевания. При дальнейшем наблюдении диагноз ОА коленного сустава у пациентки подтвердился.

У пациента О. была взята периферическая венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров была выявлена комбинация генотипов rs34195470 GG WWP2 x rs6976 TT GLT8D1, что позволило отнести пациента в группу индивидов, не имеющих данного заболевания. Дальнейшее наблюдение не подтвердило диагноз ОА коленного сустава у пациента.

У пациентки Л. была взята периферическая венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров была выявлена комбинация генотипов rs34195470 AG WWP2 x rs6976 CC GLT8D1, что позволило отнести пациентку в группу с высоким риском развития заболевания. При дальнейшем наблюдении диагноз ОА коленного сустава у пациентки подтвердился.

Применение данного способа позволит на доклиническом этапе относить больных в группы риска и своевременно реализовывать в этих группах необходимые лечебно-профилактические мероприятия по предупреждению развития ОА коленного сустава.

(57) Формула изобретения

Способ прогнозирования риска развития остеоартроза коленного сустава с учетом

генетических маркеров у населения русской национальности Центрального Черноземья России, включающий выделение ДНК из лейкоцитов периферической венозной крови и анализ полиморфных локусов rs34195470 гена WWP2 и rs6976 гена GLT8D1, прогноз высокого риска развития остеоартроза коленного сустава при выявлении комбинации
5 генотипов rs34195470 AG WWP2 x rs6976 CC GLT8D1.

10

15

20

25

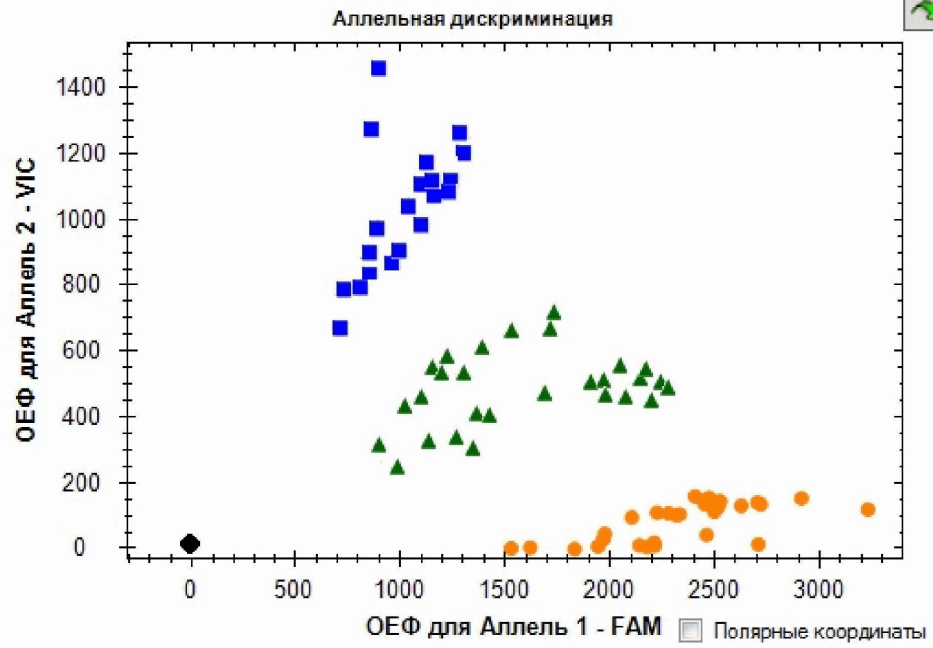
30

35

40

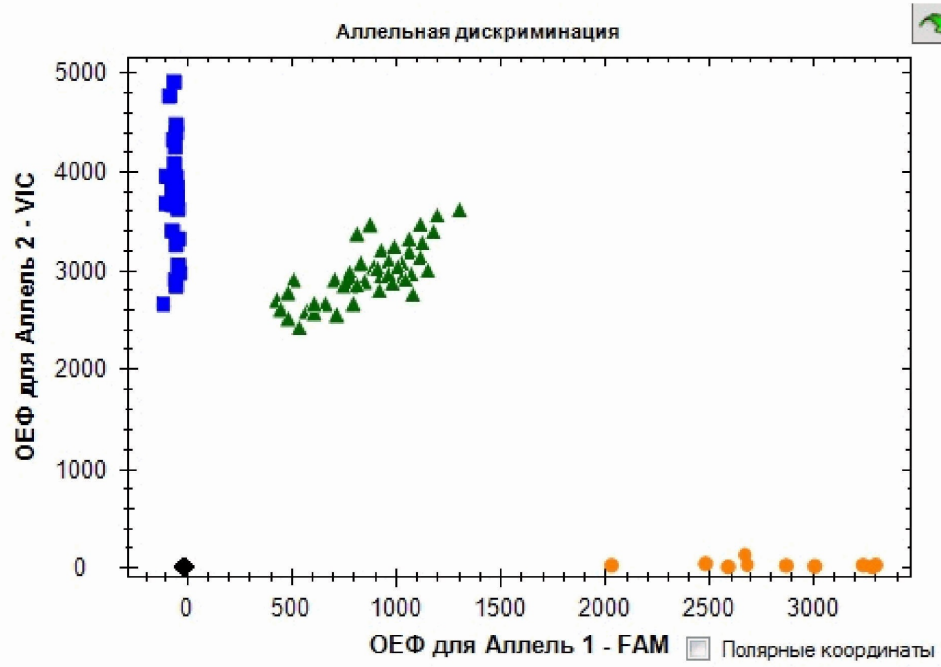
45

1



Фигура 1

2



Фигура 2