



(51) МПК
G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)
C12Q 1/6827 (2018.01)
C12Q 1/686 (2018.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 33/50 (2022.05); *C12Q 1/6806* (2022.05); *C12Q 1/6827* (2022.05); *C12Q 1/686* (2022.05)

(21)(22) Заявка: 2021130418, 19.10.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 19.10.2021

Дата регистрации:
 30.06.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 19.10.2021

(45) Опубликовано: 30.06.2022 Бюл. № 19

Адрес для переписки:

308015, Белгородская обл., г. Белгород, ул.
 Победы, 85, НИУ "БелГУ", ОИС, Крыловой
 А.С.

(72) Автор(ы):

Чурносов Михаил Иванович (RU),
 Елисеева Наталья Владимировна (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
 2580306 C1, 10.04.2016. RU 2592205 C1,
 20.07.2016. RU 2598878 C1, 27.09.2016. US
 20210118525 A1, 22.04.2021. ЕЛИСЕЕВА Н.В.
 Репликативное исследование ассоциаций
 полиморфных локусов генов LOXL1 и
 CDKN2B-AS1 с развитием первичной
 открытоугольной глаукомы у мужчин
 Центрального Черноземья РФ. Научные
 результаты (см. прод.)

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

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицинской диагностики. Осуществляют забор венозной крови, выделение ДНК из периферической венозной крови и анализ генетических маркеров CDKN2B-AS1 и LOXL1. Высокий риск развития ПОУГ у мужчин прогнозирует выявление комбинации генотипов rs2165241 TT гена LOXL1 x rs4886776 GG гена LOXL1 x rs7865618 AG гена

CDKN2B-AS1 x rs944800 GG гена CDKN2B-AS1. Изобретение обеспечивает получение критериев оценки риска развития ПОУГ у мужчин русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья РФ и не имеющих родства между собой, на основе данных о комбинации генотипов генов CDKN2B-AS1 и LOXL1. 4 ил., 4 пр.

(56) (продолжение):

биомедицинских исследований. 2020; 6(2): 198-208. ELISEEVA N. et al. Dataset of allele, genotype and haplotype frequencies of five polymorphisms CDKN2B-AS1 gene in Russian patients with primary open-angle glaucoma.

RU 2 775 430 C1

RU 2 775 430 C1

R U 2 7 7 5 4 3 0 C 1

R U 2 7 7 5 4 3 0 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)
C12Q 1/6827 (2018.01)
C12Q 1/686 (2018.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G01N 33/50 (2022.05); *C12Q 1/6806* (2022.05); *C12Q 1/6827* (2022.05); *C12Q 1/686* (2022.05)

(21)(22) Application: **2021130418, 19.10.2021**

(24) Effective date for property rights:
19.10.2021

Registration date:
30.06.2022

Priority:

(22) Date of filing: **19.10.2021**

(45) Date of publication: **30.06.2022** Bull. № 19

Mail address:

308015, Belgorodskaya obl., g. Belgorod, ul. Pobedy, 85, NIU "BelGU", OIS, Krylovoj A.S.

(72) Inventor(s):

**Churnosov Mikhail Ivanovich (RU),
Eliseeva Natalya Vladimirovna (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 THE RISK OF DEVELOPING PRIMARY OPEN-ANGLE GLAUCOMA IN MEN BASED ON GENETIC DATA**

(57) Abstract:

FIELD: medical diagnostics.

SUBSTANCE: invention relates to the field of medical diagnostics. Venous blood is taken, DNA is isolated from peripheral venous blood, and genetic markers CDKN2B-AS1 and LOXL1 are analyzed. A high risk of developing POAG in men is predicted by the identification of a combination of genotypes rs2165241 TT of the LOXL1 gene x rs4886776 GG of the LOXL1 gene x rs7865618 AG of the CDKN2B-

AS1 gene x rs944800 GG of the CDKN2B-AS1 gene.

EFFECT: invention provides for obtaining criteria for assessing the risk of developing POAG in men of Russian nationality, who are natives of the Central Black Earth Region of the Russian Federation and are not related to each other, based on data on a combination of genotypes of the CDKN2B-AS1 and LOXL1 genes.

1 cl, 4 dwg, 4 ex

C 1
2 7 7 5 4 3 0
R U

R U
2 7 7 5 4 3 0
C 1

Изобретение относится к области медицинской диагностики и предназначено для прогнозирования риска развития первичной открытоугольной глаукомы у мужчин по генетическим данным.

Первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ) представляет собой хроническую невропатию зрительного нерва с необратимой потерей поля зрения и прогрессирующим повреждением зрительного нерва. Глаукома является одной из основных причин слепоты в офтальмологии [Kapetanaris W, Chan MP, Foster PJ, et al. Global variations and time trends in the prevalence of primary open -angle glaucoma (POAG): systematic review and meta -analysis. *British Journal of Ophthalmology*. 2016; 100(1):86-93. DOI:

10 <http://doi:10.1136/bjophthalmol-2015-307223>; Барбос ЮА, Чередниченко НЛ, Карпов СМ. Анализ заболеваемости глаукомой населения Ставропольского края. *Национальный журнал глаукома*. 2018;17(3):65-75. DOI: <https://doi.org/10.25700/NJG.2018.03.08>]. В 2015 году ПОУГ затронула 57,5 миллионов человек во всем мире и 7,8 миллионов человек в Европе. Общая распространенность ПОУГ в Европе составляет 2%, в мире - 2,2% [Kreft D, Doblhammer G, Guthoff RF, et al. Prevalence, incidence and risk factors of primary open - angle glaucoma - a cohort study based on longitudinal data from a German public health in surname. *BMC Public Health*. 2019; 19: 851. DOI: <http://doi:10.1186/s12889-019-6935-6>]. В России страдает глаукомой более 1 миллиона человек. Среди клинических форм болезни наибольшее значение имеет первичная открытоугольная глаукома, которая составляет 70% в структуре всех глаукомных поражений глаз [Kreft D, Doblhammer G, Guthoff RF, et al. Prevalence, incidence and risk factors of primary open - angle glaucoma - a cohort study based on longitudinal data from a German public health in surname. *BMC Public Health*. 2019; 19: 851. DOI: <http://doi:10.1186/s12889-019-6935-6>].

Первичная открытоугольная глаукома может возникнуть, как у женщин, так и у мужчин [Kapetanaris VV, Chan MP, Foster PJ, et al. Global variations and time trends in the prevalence of primary open -angle glaucoma (POAG): systematic review and meta -analysis. *British Journal of Ophthalmology*. 2016; 100 (1): 86-93. DOI: <http://doi:10.1136/bjophthalmol-2015-307223>; Джемилева ЛУ, Загидуллина АШ, Лобов СЛ, и др. Молекулярно-генетические аспекты патогенеза первичной открытоугольной глаукомы. *Медицинская генетика*. 2013;12 (8):3-14; Онищенко АЛ, Колбаско АВ, Жилина НМ, и др.

Заболеваемость первичной глаукомой, ее гендерные особенности среди жителей крупного промышленного города Сибири. *Офтальмология*. 2014;11(4):59-67. DOI: <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2014-4-59-67>]. Большинство авторов отмечают больший риск заболеваемости открытоугольной глаукомой у мужчин, чем у женщин.

35 Зажкрытоугольной глаукомой, чаще заболевают мужчины, из-за особенности нарушение оттока жидкости, чаще двустороннее поражение глаз, и чаще бессимптомно, данная патология у мужчин встречается редко. Вероятность заболевания ПОУГ увеличивается у мужского населения с возрастом, и особенно в районах, с активно развивающей промышленностью [Барбос ЮА, Чередниченко НЛ, Карпов СМ. Анализ заболеваемости глаукомой населения Ставропольского края. *Национальный журнал глаукома*. 2018; 17(3):65-75. DOI: <https://doi.org/10.25700/NJG.2018.03.08>]. Причинами является занятость мужчин в тяжелых производствах, раннее старение организма, большая степень подверженности к стрессу, травмы орбиты, вредные привычки (курение и др.). По данным некоторых авторов также у мужчин чаще отмечается развитие хронических заболеваний (гипертоническая болезнь, ишемическая болезнь сердца и атеросклеротическая болезнь), которые являются факторами риска глаукомы [Барбос ЮА, Чередниченко НЛ, Карпов СМ. Анализ заболеваемости глаукомой населения Ставропольского края. *Национальный журнал глаукома*. 2018;17 (3):65-75. DOI:

<https://doi.org/10.25700/NJG.2018,03.08>, Джемилева ЛУ, Загидуллина АШ, Лобов СП, и др. Молекулярно-генетические аспекты патогенеза первичной открытоугольной глаукомы. Медицинская генетика. 2013;12(8):3-14; Онищенко АЛ, Колбаско АВ, Жилина НМ, и др. Заболеваемость первичной глаукомой, ее тендерные особенности среди жителей крупного промышленного города Сибири. Офтальмология. 2014; 11 (4):59-67. DOI: <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2014-4-59-67>].

Первичная открытоугольная глаукома считается полиэтиологическим заболеванием, обусловленным влиянием ряда факторов, в качестве которых рассматриваются: величина переднезадней оси глаза, толщина роговицы, анатомические особенности и степень пигментации трабекулы, наличие системной сердечно-сосудистой патологии, характер питания, курение, возраст, пол [Miglior S., Pfeiffer N., Torri V. et al. Predictive factors for open-angle glaucoma among patients with ocular hypertension in the European Glaucoma Prevention Study // *Ophthalmology*. - 2007. - Vol.114. -No. 1. - P. 3-9].

Генетические основы ПОУГ на основе полногеномного поиска ассоциаций, активно изучаются различными научными коллективами. За период с 2007 года по настоящее время выполнено 20 полногеномных исследований ПОУГ, в результате которых установлено более 150 GWAS -значимых полиморфных локусов, ассоциированных с риском развития первичной открытоугольной глаукомы [Springelkamp H, Iglesias AI, Mishra A, et al. New insights into the genetics of primary open-angle glaucoma based on meta-analyses of intraocular pressure and optic disc characteristics. *Human Molecular Genetics*. 2017; 26 (2): 438-453. DOI: <http://doi.org/10.1093/hmg/ddw399>; MacGregor S, Ong J, An J, et al. Genome-wide association study of intraocular pressure uncovers new pathways to glaucoma. *Nature Genetics*. 2018;50(8):1067-1071. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41588-018-0176-y>].

Согласно данным литературы ген LOXL1 (лизооксидаза пободная 1) кодирует белковый продукт, который необходим для образования и метаболизма эластических волокон и основных компонентов фибриллярных агрегатов. Он является ключевым в метаболизме внеклеточного матрикса и имеет важное значение на начальных стадиях аномального фиброгенеза в тканях. Повышение экспрессии гена LOXL1 и соответственно увеличение продукции компонентов эластических волокон способствует образованию аномально сшитых агрегатов в путях оттока внутриглазной жидкости, что приводит к нарушению оттока жидкости из глаза и повышению внутриглазного давления [Schlotzer-Schrehandf U, Hammer CM, Krysta AW, et al. Molecular pathology of pseudoexfoliation syndrome / glaucoma - new insights from LOXL1 gene associations. *Ophthalmology*. 2012; 109 (10):944-51. DOI: <http://doi:10.1007/s00347->

Ген CDKN2B-AS1 расположен в кластере генов CDKN2B и CDKN2A на хромосоме 9p21 и относится к группе генов, контролирующей образование длинных некодирующих РНК (lncRNAs). Кодированная им lncRNA осуществляет взаимодействие с поликомб репрессивными комплексами 1 (PRC1) и 2 (PRC2), что обуславливает значительные эпигенетические изменения (осуществляются процессы метилирования и моноубиквитинирования гистоновых белков хроматина и т.д.). Это в свою очередь приводит к существенным изменениям структуры хроматина и оказывает непосредственное влияние на экспрессию генов.

В Российской Федерации исследования вовлеченности генов CDKN2B-AS1 и LOXL1 в формирование предрасположенности к ПОУГ единичны и фрагментарны, а данные о роли комбинации генотипов генов CDKN2B-AS1 и LOXL1 в развитии ПОУГ у мужчин отсутствуют.

Для оценки сложившейся патентной ситуации был выполнен поиск по охраняемым документам за период с 1990 по 2021 гг. Анализ документов производился по

направлению: способ прогнозирования риска развития первичной открытоугольной глаукомы у мужчин на основе молекулярно-генетических данных в зависимости от полиморфных маркеров генов CDKN2B-AS1 и LOXL1. Источники информации: сайты Федерального института промышленной собственности <http://fips.ru>.

5 В изученной научно-медицинской и доступной патентной литературе авторами не было обнаружено способа прогнозирования риска развития ПОУГ у мужчин на основе данных о SNP x SNP взаимодействий и на основе данных о комбинации генотипов генов CDKN2B-AS1 и LOXL1.

10 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: $K = \text{КГ} / \text{ЦТР} \cdot 50$, где К-биомеханический коэффициент роговицы, КГ - корнеальный гистерезис, ЦТР - центральная толщина роговицы, и при значении менее 0,82 прогнозируют риск развития и прогрессирования
15 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
20 оборудования: анализатор биомеханических свойств глаза и пахиметр, не учитывается половая специфичность.

Патент РФ №2483306 (опубликован 27.05.2013), в котором описан способ прогнозирования заболевания первичной открытоугольной глаукомы путем забора
25 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
30 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
35 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, не учитывается половая специфичность.

Патент РФ №2517233, опубликован 27.05.2014, описывает способ прогнозирования
40 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
45 процесса с дальнейшим проведением соответствующих адекватных лечебных мероприятий. Недостатком является трудоемкость исследования, т.к. необходимо исследовать сразу два биологических материала, а также, что он не учитывает роль генетических полиморфизмов, не учитывается половая специфичность.

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 + 16 63A/G TNFR2. Материалом для исследования служила венозная кровь, выделение геномной ДНК проводилось методом фенольнохлороформной экстракции. Типирование локуса + 16 63A/G TNFR2 проводилось с помощью полимеразной цепной реакции синтеза ДНК на амплификаторе IQ5 (Bio-Rad) в режиме real time.

Задачей настоящего исследования является расширение арсенала способов диагностики прогнозирования риска развития первичной открытоугольной глаукомы, а именно создание способа прогнозирования риска развития ПОУГ у мужчин на основе данных о комбинации генотипов генов CDKN2B-AS1 и LOXL1.

Технический результат использования изобретения - получение критериев оценки риска развития ПОУГ у мужчин русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья РФ и не имеющих родства между собой, на основе данных о комбинации генотипов генов CDKN2B-AS1 и LOXL1, включающий:

- забор венозной крови;
- выделение ДНК из периферической венозной крови;
- анализ полиморфизмов rs2165241 и rs4886776 гена LOXL1 и rs7865618 и rs944800 гена CDKN2B-AS1;
- прогнозирование высокого риска развития ПОУГ у мужчин при выявлении комбинации генотипов rs2165241 ТТ гена LOXL x rs4886776 GG гена LOXL x rs7865618 AG гена CDKN2B-AS1 x rs944800 GG гена CDKN2B-AS1.

Новизна и изобретательский уровень заключаются в том, что из уровня техники не известна возможность прогноза развития ПОУГ у мужчин на основе данных о комбинации генотипов rs2165241 ТТ гена LOXL x rs4886776 GG гена LOXL x rs7865618 AG гена CDKN2B-AS1 x rs944800 GG гена CDKN2B-AS1.

Способ осуществляют следующим образом:

Выделение геномной ДНК из периферической крови осуществляют методом фенольно-хлороформной экстракции [Miller, S. A. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells / S. A. Miller, D. D. Dykes, H. F. Polesky // Nucleic Acids. Res. - 1988. - Vol.16, №3. - P. 1215] 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 МдС1 г, ЮмМ трис-НСl (рН=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 (рН=8,0) и 75 мМ NaCl, ресуспензируют. Затем прибавляют 0,4 мл 10% SDS, 35 мкл протеиназы К (10 мг/мл) и инкубируют образец при 37°C в течение 16 часов.

На втором этапе из полученного лизата последовательно проводят экстракцию ДНК равными объемами фенола, фенол-хлороформа (1:1) и хлороформа с центрифугированием при 4000 об/мин. в течение 10 минут. После каждого центрифугирования производят отбор водной фазы. ДНК осаждают из раствора двумя объемами охлажденного 96% этанола. После лиофилизации полученную ДНК

растворяют в бидистиллированной, деионизованной воде и хранят при -20°C .

Анализ полиморфных маркеров rs2165241 и rs4886776 гена LOXL1 и rs7865618 и rs944800 гена CDKN2B-AS1 осуществляют методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на термоциклере CFX-96 Real-Time System (Bio-Rad) с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров и зондов (синтезированы в ООО «Тест-Ген» (Ульяновск)).

Аmplification геномной ДНК производят в реакционной смеси, суммарным объемом 10 мкл, включающей смесь для ПЦР LOXL1 или CDKN2B-AS1 - 4 мкл, Taq-полимеразу - 2 мкл, исследуемый образец (-30 нг ДНК/мкл) - 1 мкл, деионизованная вода - 3 мкл.

Генотипирование исследуемых образцов осуществляли 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 класса rs2165241 LOXL1, ● - TT, ■ - CC, ▲ - TC, ◆ - 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 rs4886776 LOXL1, ● - 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 rs7865618 CDKN2B-AS1, ● - AA, ■ - GG, ▲ - AG, ◆ - 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 rs944800 CDKN2B-AS1, ● - AA, ■ - GG, ▲ - GA, ◆ - отрицательный контроль.

Метод MDR в его модификации MB-MDR [Mbmdr: an R package for exploring gene-gene interactions associated with binary or quantitative traits / M. L. Calle, V. Urrea, N. Malats, K. Van Steen // Bioinformatics. - 2010. - Vol. 26, №17. - P. 2198-2199] применяли для изучения интерлокусных взаимодействий, ассоциированных с ПОУГ у мужчин. Рассматривали двух-, трех-, четырех-, пяти- и шестилокусные модели. Расчеты проводили с ковариатами в программе MB-MDR (версия 2.6) в программной среде R. Наиболее значимые модели интерлокусных взаимодействий, связанных с ПОУГ, отбирали на основе поправки Бонферрони (при этом рассматривалось число возможных комбинаций восьми изучаемых SNPs генов CDKN2B-AS1 и LOXL1 при 2-, 3-, 4-, 5- и 6-локусных моделях).

В дальнейший анализ (валидация моделей с помощью пермутационного теста) включали модели межлокусных взаимодействий, соответствующие следующим критериям: 2-х локусные модели - $p < 1,78 \cdot 10^{-3}$ ($< 0,05/28$), 3-х локусные модели - $p < 8,92 \cdot 10^{-4}$ ($< 0,05/56$), 4-х локусные модели - $p < 7,14 \cdot 10^{-4}$ ($< 0,05/70$), 5-ти локусные модели - $p < 8,92 \cdot 10^{-4}$ ($< 0,05/56$), 6-ти локусные модели - $p < 1,78 \cdot 10^{-3}$ ($< 0,05/28$). Для отобранных в соответствии с вышеуказанными критериями наиболее значимых моделей SNPxSNP взаимодействий, ассоциированных с ПОУГ у мужчин, выполнялся пермутационный тест (проводили 1000 пермутаций). Статистически значимым считали $p_{perm} \leq 0,001$. Отдельные комбинации генотипов, связанные с риском развития ПОУГ у мужчин определяли

методом MB-MDR при $p < 0,05$.

Возможность использования предложенного способа для оценки прогнозирования риска развития ПОУГ у мужчин подтверждает анализ результатов наблюдений 463 пациентов, из которых 246 больных с первичной открытоугольной глаукомой и 217 5 мужчин контрольной группы (ПОУГ отсутствовала). Среди больных средний возраст-70, 93+8, 70 лет, в контрольной группе средний возраст-62, 02+11,54 лет. Изучаемые 10 группы включали мужчин русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья РФ и не имеющих родства между собой. В группу больных были включены мужчины с диагнозом ПОУГ, подтвержденного необходимыми 15 методами исследования в клинических условиях. Для диагностики глаукомы использовали 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 15 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 проводили с их информированного согласия. Исследование проводили под контролем этического комитета медицинского института НИУ «БелГУ».

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

При изучении SNP x SNP взаимодействий наиболее значимой четырехлокусной моделью, вовлеченную в формирование ПОУГ у мужчин, является rs2165241 и rs 25 rs4886776 гена LOXL1 и rs7865618 и rs944800 гена CDKN2B-AS1 ($P_{perm} \leq 0,001$). С развитием заболевания наиболее значимая ассоциация выявлена для комбинации генотипов rs2165241 TT гена LOXL x rs4886776 GG гена LOXL x rs7865618 AG гена CDKN2B-AS1 x rs944800 GG гена CDKN2B-AS1 ($\beta = 1,53$, $p = 0,017$), имеющей рисковую направленность.

30 В качестве примеров конкретного применения разработанного способа проведено генетическое обследование мужчин русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья РФ и не имеющих родства между собой: проведено генетическое обследование по локусам rs2165241 и rs rs4886776 гена LOXL1 и rs7865618 и rs944800 гена CDKN2B-AS1.

35 У пациента С. была взята венозная кровь, проведено генотипирование ДНК-маркеров, при анализе вовлеченности полиморфных локусов rs2165241 и rs rs4886776 гена LOXL1 и rs7865618 и rs944800 гена CDKN2B-AS1 была выявлена комбинации rs2165241 TT гена LOXL x rs4886776 GG гена LOXL x rs7865618 AG гена CDKN2B-AS1 x rs944800 GG гена CDKN2B-AS1, что позволило отнести пациента в группу больных с повышенным риском развития ПОУГ. Дальнейшее наблюдение подтвердило диагноз первичной 40 открытоугольной глаукомы у пациента.

У пациента И. была взята венозная кровь, проведено генотипирование ДНК-маркеров, при анализе вовлеченности полиморфных локусов rs2165241 и rs rs4886776 гена LOXL1 и rs7865618 и rs944800 гена CDKN2B-AS1 была выявлена комбинации генотипов rs21652 41 TC гена LOXL1 x rs4886776 AA гена LOXL1 x rs7865618 AG гена CDKN2B-AS1 x rs944 8 00 GG гена CDKN2B-AS1, что позволило отнести пациента в 45 группу пациентов с низким риском развития ПОУГ. Дальнейшее наблюдение не подтвердило диагноз первичной открытоугольной глаукомы у пациента.

У пациента М. была взята венозная кровь, проведено генотипирование ДНК-

маркеров, при анализе вовлеченности полиморфных локусов rs2165241 и rs rs4886776 гена LOXL1 и rs7865618 и rs944800 гена CDKN2B-AS1 была выявлена комбинации генотипов rs2165241 TT гена LOXL1 x rs4886776 GG гена LOXL1 x rs7865618 AA гена CDKN2B-AS1 x rs944 8 00 GA гена CDKN2B-AS1, что позволило отнести пациента в
5 группу больных с низким риском развития ПОУГ. Дальнейшее наблюдение пациентки не подтвердило диагноз первичной открытоугольной глаукомы.

У пациента Д. была взята венозная кровь, проведено генотипирование ДНК-маркеров, при анализе вовлеченности полиморфных локусов rs2165241 и rs rs4886776 гена LOXL1 и rs7865618 и rs944800 гена CDKN2B-AS1 была выявлена комбинации
10 генотипов rs2165241 TC гена LOXL1 x rs4886776 AA гена LOXL1 x rs7865618 AA гена CDKN2B-AS1 x rs944800 GA гена CDKN2B-AS1, что позволило отнести пациента в группу пациентов с низким риском развития ПОУГ. При дальнейшем наблюдении диагноз первичной открытоугольной глаукомы у пациента не подтвердился.

Применение данного способа позволит на доклиническом этапе формировать среди
15 мужчин группы риска и своевременно реализовывать в этих группах необходимые лечебно-профилактические мероприятия по предупреждению развития ПОУГ у мужчин.

(57) Формула изобретения

Способ прогнозирования риска развития первичной открытоугольной глаукомы
20 (ПОУГ) у мужчин русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья РФ и не имеющих родства между собой, включающий забор венозной крови, выделение ДНК из периферической венозной крови, анализ генетических маркеров CDKN2B-AS1 и LOXL1, отличающийся тем, что высокий риск развития ПОУГ у мужчин прогнозирует выявление комбинации генотипов rs2165241 TT гена LOXL1 x
25 rs4886776 GG гена LOXL1 x rs7865618 AG гена CDKN2B-AS1 x rs944800 GG гена CDKN2B-AS1.

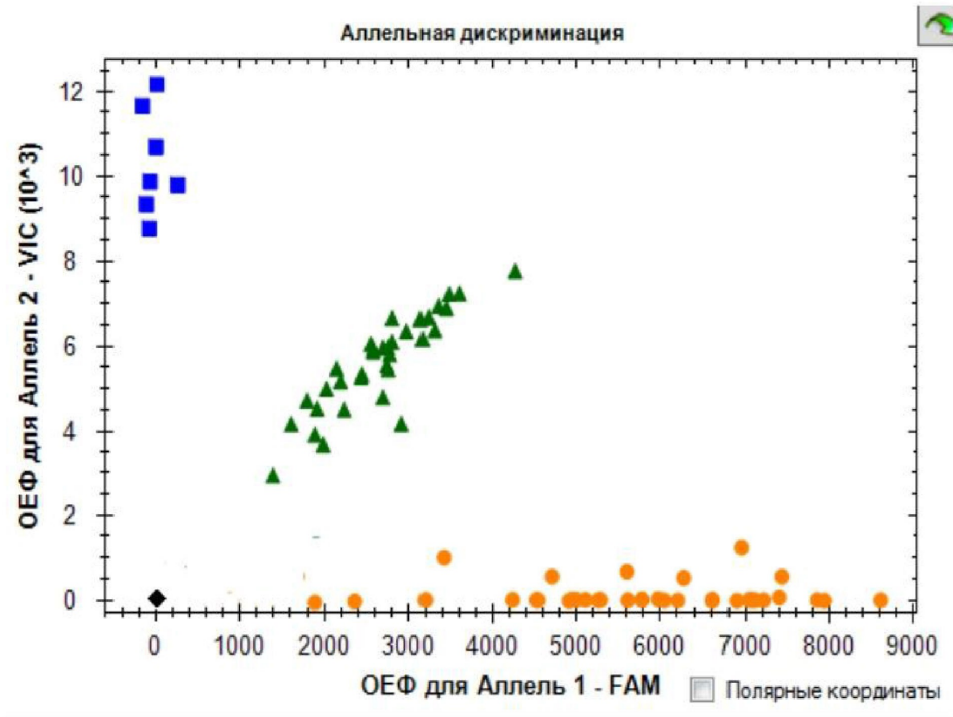
30

35

40

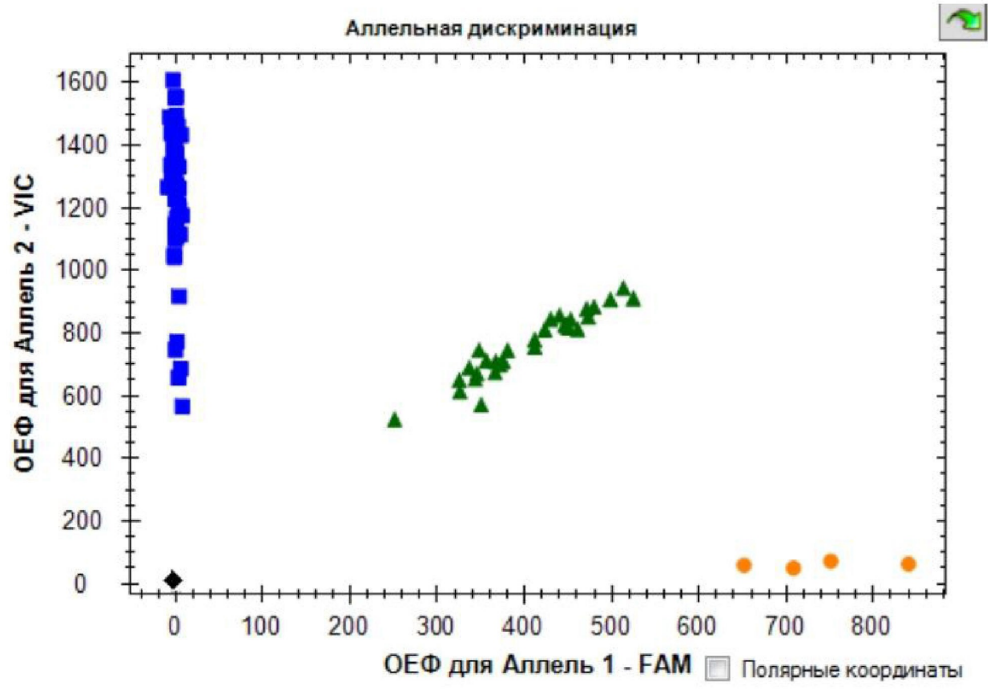
45

1

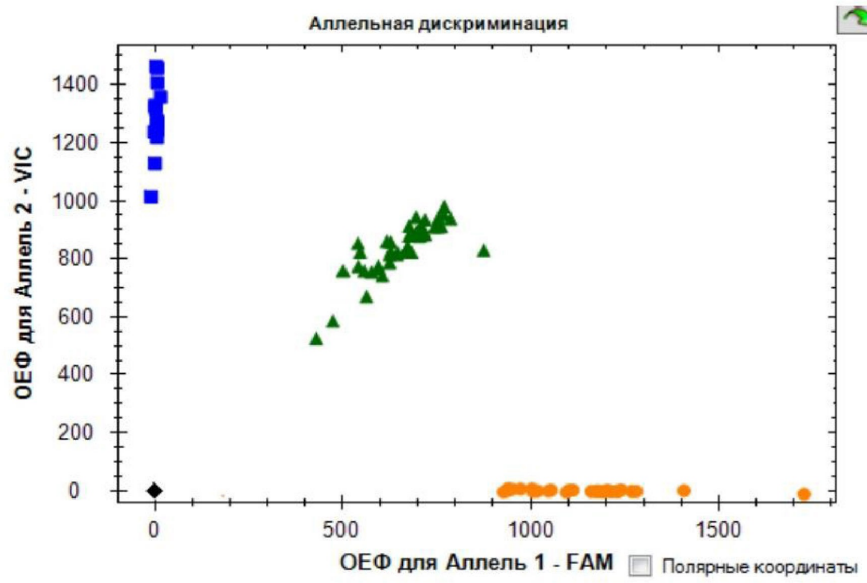


Фигура 1

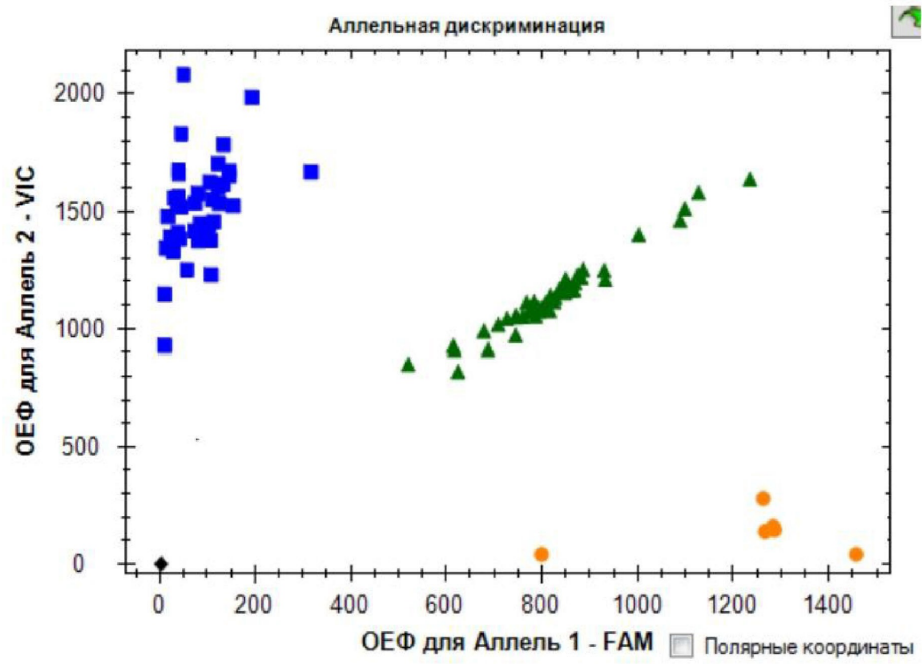
2



Фигура 2



Фигура 3



Фигура 4