

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: действует (последнее изменение статуса: 06.08.2022)  
 Пошлина: учтена за 11 год с 02.11.2022 по 01.11.2023. Установленный срок для уплаты пошлины за 12 год: с 02.11.2022 по 01.11.2023. При уплате пошлины за 12 год в дополнительный 6-месячный срок с 02.11.2023 по 01.05.2024 размер пошлины увеличивается на 50%.

(21)(22) Заявка: [2012146651/15](#), 01.11.2012(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
01.11.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 01.11.2012

(45) Опубликовано: [10.01.2014](#) Бюл. № 1

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2383019 C1, 27.02.2010. САЛТЫКОВА И.В. Патогенетика иммунного ответа у больных бронхиальной астмой и описторхозом. Автореф. дисс. канд. мед. наук. - Томск, 2010, 21 с. [Найдено 16.08.2013] [он-лайн], Найдено из Интернета: URL: <http://www.medgenetics.ru/UserFile/File/Doc/Diss-sovet/Saltykova.doc> OGORODOVA L.M. et al. A pilot screening of

prevalence of atopic states and opisthorchosis and their relationship in people of Tomsk Oblast. Parasitol Res. 2007 Sep; 101(4):1165-1168. Epub 2007 Jun 5 [Найдено 16.08.2013] [он-лайн], Найдено из Интернета: URL: <http://mfreidin.medgenetics.ru/Papers/Parasitol%20Res/Parasitology%20Research.pdf>.

Адрес для переписки:

634050, г.Томск, Московский тракт, 2, ГБОУ ВПО СибГМУ, отдел ИС и В, Н.Г. Зубаревой

(72) Автор(ы):

Огородова Людмила Михайловна (RU),  
 Фрейдин Максим Борисович (RU),  
 Салтыкова Ирина Владимировна (RU),  
 Селиванова Полина Александровна (RU),  
 Кириллова Наталья Александровна (RU),  
 Куликов Евгений Сергеевич (RU),  
 Кремер Елена Эдуардовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Сибирский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России) (RU)

## (54) СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНОГО РИСКА РАЗВИТИЯ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ В РЕГИОНАХ С ВЫСОКОЙ И НИЗКОЙ РАСПРОСТРАНЕННОСТЬЮ ГЕЛЬМИНТНЫХ ИНФЕКЦИЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и предназначено для прогнозирования индивидуального риска развития бронхиальной астмы в регионах с высокой и низкой распространенностью гельминтных инфекций. Определяют факт наличия либо отсутствия описторхоза, полиморфные варианты генов и вероятность отнесения индивида к группе с низким или высоким риском развития бронхиальной астмы. При обнаружении одной из комбинаций риска в соответствии с моделью SOCS5-IFNG-описторхоз у пациента диагностируют высокий риск развития бронхиальной астмы. В случае обнаружения одной из протективных комбинаций в соответствии с моделью IL4-TBX21-SOCS5 у пациента диагностируют низкий риск развития бронхиальной астмы. Изобретение позволяет прогнозировать высокий и низкий риск бронхиальной астмы с учетом описторхозной инвазии. 2 табл., 2 пр.

Изобретение относится к области биотехнологии и медицины, в частности к иммунологии, аллергологии и медицинской паразитологии, конкретно к прогнозированию бронхиальной астмы на фоне описторхозной инвазии, и может быть использовано в медицине, иммунологии и биотехнологии с целью разработки технологий первичной профилактики аллергопатологии в мировых очагах инфекций на основе клеточной регуляции.

Одной из областей медицины, испытывающей дефицит технологий, является область профилактики и прогнозирования аллергических заболеваний. Согласно

данным эпидемиологических исследований наблюдается неуклонный рост распространенности аллергопатологии в развитых странах, в то время как ее уровень в развивающихся странах не изменяется. Подобная тенденция различий распространенности аллергопатологии может быть объяснена с позиции гигиенической концепции, предложенной Strachan D.P. (1989) [1], согласно которой в условиях урбанизации повышение вероятности развития аллергических заболеваний определяется недостаточностью инфекционной стимуляции в раннем онтогенезе, необходимой для правильного развития иммунной системы и формирования супрессорных в отношении аллергии механизмов. Однако только гигиеническая гипотеза не исчерпывает фундаментальных механизмов, контролирующих иммунный ответ и развитие болезней.

Многочисленные факты свидетельствуют о способности гельминтных инфекций модифицировать иммунный ответ хозяина, что оказывает существенное влияние на риск развития и клиническое течение аллергии. Характер и степень модифицирующего влияния инфекционных антигенов на развитие и клиническое течение аллергических заболеваний зависят от конкретных условий, в том числе генетических свойств индивидуумов. Существующие на сегодняшний день сведения об иммунных механизмах моделирования риска аллергических заболеваний у лиц с паразитарными заболеваниями недостаточны и требуют глубокого анализа их молекулярных основ. Изучение модифицирующего влияния гельминтных антигенов на формирование иммунного ответа у больных аллергическими заболеваниями особенно актуально для регионов с высокой распространенностью паразитарных инвазий.

Согласно иммуноэпидемиологическому исследованию, осуществленному Л.М. Огородовой и соавт. в природных очагах описторхоза Томской области, у больных бронхиальной астмой на фоне хронического описторхоза регистрируется относительное снижение уровня патогенетически значимых провоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-5) и снижение уровней специфических IgE по сравнению с больными бронхиальной астмой без описторхоза [2]. Выявленные признаки снижения напряженности реакций гиперчувствительности немедленного типа на фоне описторхозной инвазии представляют значительный интерес в плане исследования молекулярных иммунных механизмов, контролирующих различные звенья патогенеза аллергии.

Таким образом, подверженность к неинфекционным мультифакториальным заболеваниям, обусловленная генотипом человека, имеет важное значение в формировании риска и должна быть учтена при разработке подходов к научно-обоснованному прогнозированию болезней человека, а разработка способа прогнозирования индивидуального риска развития бронхиальной астмы в регионах с высокой и низкой распространенностью гельминтных инфекций является важной и востребованной задачей, направленной на оптимизацию диагностики аллергопатологии и минимизацию затрат медицинских ресурсов.

В настоящее время известно несколько способов прогнозирования бронхиальной астмы.

Так, известен способ прогнозирования риска развития бронхиальной астмы (RU №2324937, от 20.05.2008), основанный на определении генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов ИЛ-4 и ИЛ-4Ра. Для прогнозирования риска развития бронхиальной астмы исследуют ДНК из лимфоцитов периферической венозной крови. Определяют генотипы и аллели полиморфных вариантов генов интерлейкина-4 методом полимеразной цепной реакции ДНК с последующим рестрикционным анализом. При выявлении аллеля IL4\*Т промоторного полиморфизма -590С/Т гена IL4 у татар, генотипа Ile50/Ile50 полиморфизма Ile50Val гена IL4Ra у русских прогнозируют высокий риск развития бронхиальной астмы у обследуемого. Недостатками способа являются низкая чувствительность и специфичность, ограниченная область применения, поскольку количество оцениваемых генов крайне мало, а бронхиальная астма является мультифакториальным заболеванием, вклад в развитие которого могут вносить многие гены [3].

Известен способ прогнозирования атопической бронхиальной астмы (EP 1954810, от 13.08.2008), основанный на определении аллельных вариантов гена инозитол полифосфата 4-фосфатазы (INPP4A), который, как известно, является важным регулятором активации тромбоцитов. Изобретение, также, может использоваться для выявления предрасположенности к другим иммунологическим заболеваниям, таким как аутоиммунные заболевания, воспалительные заболевания, рак, рассеянный склероз, фиброз, туберкулез, саркоидоз, гипертонии и расстройств, развивающихся вследствие гипертонии, диабета и расстройств, развивающихся в связи с диабетом, злоупотреблением алкоголем, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), дегенеративные заболевания суставов, эпилепсия, артрит и т.д., где инозитол полифосфат 4-фосфатаза (INPP4A) может играть важную роль. Это свидетельствует о низкой специфичности данного способа по отношению к бронхиальной астме [4].

Наиболее близким к предлагаемому является способ прогнозирования риска

развития бронхиальной астмы (RU №2383019, от 27.02.2010), который выбран в качестве прототипа [5]. В известном способе прогнозирования риска развития бронхиальной астмы используется прогностическая модель, основанная на данных генотипирования с учетом описторхозной инвазии в регионах, эндемичных по гельминтной инвазии. В ДНК, выделенной из крови человека, определяют полиморфные варианты генов SOCS5 (rs3890580), PIASX (rs9304337), дополнительно учитывают факт наличия/отсутствия описторхоза и рассчитывают вероятность отнесения индивида к группе с низким риском развития бронхиальной астмы и высоким риском развития бронхиальной астмы. Точность предсказания на основе известного способа составляет 64-75%. Модель, положенная в основу расчетов известного метода, может содержать систематическую ошибку, поскольку она построена на результатах оценки линейных вкладов генов в развитие астмы с помощью логистической регрессии. Эти оценки могут быть завышены в связи с небольшим размером исследованных выборок. Проблема может быть решена формированием очень больших выборок для исследования, что не всегда технически возможно и практично. Альтернативным решением является разработка специальных методов статистики, позволяющих проводить анализ ассоциаций с учетом многоуровневых межгенных и генно-средовых взаимодействий. Одним из таких методов, ставших в последнее время очень популярным, является подход, называемый Multifactor-Dimensionality Reduction (MDR) [6].

Новая техническая задача - повышение точности, информативности и расширение области применения диагностики в результате создания методики.

Для решения поставленной задачи в способе прогнозирования индивидуального риска развития бронхиальной астмы в регионах с высокой и низкой распространенностью гельминтных инфекций определяют факт наличия, либо отсутствия описторхоза, определяют полиморфные варианты генов и определяют вероятность отнесения индивида к группе с низким риском развития бронхиальной астмы и высоким риском развития бронхиальной астмы, причем определяют олиморфные варианты генов интерлейкина-4 (IL4), гена, кодирующего транскрипционный фактор T-bet 21 (TBX21),

гена супрессора цитокинового сигнала 5 (SOCS5), гена интерферона-гамма (IFNG), и при обнаружении у пациента одной из комбинаций риска в соответствии с моделью SOCS5/IFNG/OPI:

C/C - T/C - 0, либо G/C - C/C - 1, либо C/C - T/T - 1,  
где SOCS5 - генотипы SOCS5 (rs6737848): C/C, G/C,  
IFNG - генотипы IFNG (rs2069705) T/C, C/C, T/T,

OPI - описторхоз, обозначаемой при его наличии -1, при его отсутствии - 0,  
у пациента диагностируют высокий риск развития бронхиальной астмы, в случае обнаружения у пациента одной из протективных комбинаций в соответствии с моделью IL4/TBX21/SOCS5

C/T - G/G - C/C, либо C/T - G/A - C/C, либо C/T - A/A - C/C, либо C/C - G/A - G/C  
где IL4- генотипы IL4 (rs2070874): C/T, C/C;  
TBX21 - генотипы TBX21 (rs11652969): G/G, G/A, A/A;  
SOCS5 - генотипы SOCS5 (rs6737848): C/C, G/C

у пациента диагностируют низкий риск развития бронхиальной астмы.

Из уровня техники не известно критериев прогнозирования риска развития бронхиальной астмы с учетом проанализированных генов, таким образом, изобретение соответствует критерию «новизна». Кроме того, разработана новая прогностическая модель оценки риска развития бронхиальной астмы с использованием новых критериев определения вероятности отнесения индивида к группе с низким риском развития бронхиальной астмы и высоким риском развития бронхиальной астмы на основе метода Multifactor-Dimensionality Reduction (MDR). Таким образом, изобретение соответствует критерию «существенные отличия».

Способ апробирован в клинических условиях, таким образом, соответствует критерию «промышленная применимость».

Способ осуществляют следующим образом:

Обследованию подлежат пациенты с симптомами хронических неспецифических заболеваний легких, лица сотягощенной наследственностью по бронхиальной астме, пациенты с диагностированной описторхозной инвазией. 1.Натощак производят забор венозной крови пациента в объеме 5 мл. 2.Проводят выделение ДНК по стандартной методике фенол-хлороформной экстракции [8]. К 0,7 мл крови, стабилизированной ЭДТА (0,1 мл 0,5М раствора ЭДТА на 1 мл крови), в микропробирки типа «эппендорф» добавляли 0,8 мл SSC, перемешивают, затем центрифугируют в течение 2 минут при 12000-13000 об/мин, после чего осторожно выливают супернатант. К осадку добавляют 1,4 мл SSC и сильно встряхивают, чтобы разбить осадок, после чего, снова центрифугируют при 12000-13000 об/мин, в течение 2 минут. После центрифугирования супернатант удаляют и последнюю каплю снимают фильтровальной бумагой. К осадку добавляют 270 мкл 0,2М натрия ацетата

(рН 7,0), тщательно и долго перемешивают, встряхивают до полной гомогенизации на протяжении 6-10 минут. К содержимому добавляют 30 мкл SDS, перемешивают и оставляют на 1 час в термостате при температуре 37°C, периодически перемешивая. Затем добавляют фенол-хлороформ (в соотношении 1:1) в равном объеме (примерно 300 мкл) и плавно перемешивают в течение 8-10 минут, после чего центрифугируют при 13000 об/мин 8 минут. После центрифугирования водную фазу (осторожно, не захватывая интерфазу) переносят в чистую пробирку эппендорф. К супернатанту в чистой пробирке эппендорф добавляют 1 мл 96% этилового спирта комнатной температуры, затем встряхивают для осаждения ДНК, после этого вращают пробирки для закручивания ДНК в комочек. Затем центрифугируют в течение 2 минут при 12000 об/мин, чтобы комочек ДНК приклеился ко дну пробирки, после чего осторожно удаляют спирт. На следующем этапе добавляют 1 мл 70% этилового спирта, перемешивают, после чего центрифугируют при аналогичных условиях, затем спирт удаляют. ДНК подсушивают на воздухе в течение 5-10 минут, добавляют 50 мкл деионизованной воды и оставляют на ночь для полного растворения ДНК. Выделенную ДНК замораживают и хранят при -20°C до проведения эксперимента. 3. Осуществляют генотипирование с помощью анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов генов IL4 (rs2070874), SOCS5 (rs6737848), IFNG (rs2069705), TBX21 (rs1 1652969). При этом не существует ограничений в методах определения аллельных вариантов однонуклеотидных замен в крови человека. Можно, например, использовать метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для проведения ПЦР готовят реакционную смесь: 2,5 пмоль специфических праймеров, 2 ммоль каждого dNTP, 1,2 мл 10x реакционного буфера, 1,5 ммоль MgCl<sub>2</sub>, 0,5 Ед Taq ДНК-полимеразы (SibEnzyme, Россия), 100-200 нг геномной ДНК. Смесь помещают в 0,5 мл пробирки типа «Эппендорф», настилают сверху минеральное масло для предотвращения испарения и амплифицируют в автоматических минициклерах 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) и ТП4-ПЦР-01-Терцик (ДНК-Технология). Программа амплификации включает предварительную денатурацию при 95°C в течение 3 минут, с последующими 30-35 циклами отжига при температуре соответствующей пары праймеров 60-64°C (40 сек), элонгации цепи при 72°C (50 сек) и денатурации при 95°C (20 сек). Программу завершает финальная элонгация при 72°C в течение 3 минут. Амплификат подвергают гидролизу соответствующей рестриктазой при оптимальной для фермента температуре на протяжении 12-24 ч. Рестрикционная смесь включает 5-7 мкл амплификата, 1,0-1,2 мкл 10x буфера для рестрикции, поставляемого фирмой - производителем («Сибэнзим», Новосибирск; NEB, Великобритания), и 1-5 единиц активности фермента (в зависимости от эффективности его работы). Для генотипирования полиморфизма IL4 анализ длин рестрикционных фрагментов осуществляли в полиакриламидном геле (7%), для других полиморфных вариантов - в 3% агарозном геле. Фрагменты ДНК окрашивают бромистым этидием и визуализируют в ультрафиолетовом свете с применением компьютерной видеосъемки на приборе «UV-VIS Imager-II» (США).

4. Определяют наличие или отсутствие описторхоза (трехкратная копроовоскопия, либо дуоденальное зондирование)

и при обнаружении у пациента одной из комбинаций риска в соответствии с моделью SOCS5/IFNG/OPI:

C 1C - T/C - 0, либо G/C - C/C - 1, либо C/C - T/T - 1,

где SOCS5 - генотипы SOCS5 (rs6737848): C/C, G/C,

IFNG - генотипы IFNG (rs2069705) T/C, C/C, T/T,

OPI - описторхоз, обозначаемой при его наличии -1, при его отсутствии - 0, у пациента диагностируют высокий риск развития бронхиальной астмы, в случае обнаружения у пациента одной из протективных комбинаций в соответствии с моделью IL4/TBX21/SOCS5

C/T - G/G - C/C, либо C/T - G/A - C/C, либо C/T - A/A - C/C, либо C/C - G/A - G/C

где IL4- генотипы IL4 (rs2070874): C/T, C/C;

TBX21 - генотипы TBX21 (rs1 1652969): G/G, G/A, A/A;

SOCS5 - генотипы SOCS5 (rs6737848): C/C, G/C

у пациента диагностируют низкий риск развития бронхиальной астмы. Выбор прогностических критериев предлагаемого способа основан на анализе результатов экспериментальной работы и клинических исследований:

В исследование были включены 107 больных БА, 103 больных описторхозом, 100 больных БА на фоне описторхоза и 126 здоровых индивидов. В рамках проведенного исследования проанализированы полиморфизмы генов цитокинов и молекул регуляции сигнальных каскадов, и оценена их функциональная значимость в отношении БА, описторхоза и сочетания этих заболеваний у русских жителей Томской области. В ходе выполнения работы проанализировано 10 полиморфных вариантов генов IL4, IL4RA, STAT5A, SOCS5, PIAS3, PIASY, TBX21, IFNG, IFNGR2, GATA3 (табл.1).

Полиморфизм гена IL4RA представляет собой однонуклеотидную замену,

приводящую к изменению аминокислоты Pe/Val в пептиде. Полиморфизмы IFNG и IL4 являются однонуклеотидными заменами, полиморфизм IFNGR2 - делецией одного нуклеотида; эти полиморфные варианты расположены в промоторной области генов. Полиморфизмы генов STAT5A, SOCS5, PIAS3, PIASY, TBX21, GATA3 являются однонуклеотидными заменами и расположены в интронах.

Общими критериями включения для всех групп было отсутствие родственных связей между индивидами, этническая принадлежность к европеоидам, возраст от 18 до 65 лет.

Критерии включения в группу больных БА:

- положительные аллергопробы с 1 и более аэроаллергенами;
- пациенты, имеющие ранее подтвержденный диагноз бронхиальной астмы;
- документированные сведения об обратимости обструкции при проведении пробы с b2-агонистом >15%;
- наличие подтвержденного ранее синдрома атопии (отягощенный семейный atopический анамнез, уровень IgE сыворотки >100 МЕ/мл, положительные результаты скарификационного алерготестирования);
- наличие данных исследования функции внешнего дыхания по результатам спирографии и провокационного теста с метахолином (при отсутствии противопоказаний);
- отрицательные результаты анализов на описторхоз (обнаружение яиц описторхисов в фекалиях и/или дуоденальном содержимом и/или отрицательный результат при проведении ПЦР-тестирования).

Выборку больных БА составили 107 индивидов, средний возраст  $\pm$ S.D. которых был 40,6 $\pm$ 12,9, из них 79 женщин, средний возраст  $\pm$ S.D. которых составил 43,5 $\pm$ 12,3 года и 28 мужчин средний возраст  $\pm$ S.D. - 32,6 $\pm$ 11,5 лет.

Критерии включения в группу больных хроническим описторхозом:

- пациенты, имеющие ранее подтвержденный или впервые выявленный диагноз хронического описторхоза;
- положительные результаты анализов на описторхоз (обнаружение яиц описторхисов в фекалиях и/или дуоденальном содержимом и/или положительный результат при проведении ПЦР-тестирования);
- пациенты, не получавшие антигельминтную терапию в отношении описторхоза в течение 5 лет до включения в исследование.

Выборку больных описторхозом составили 103 индивида (37,2 $\pm$ 12,5 лет), из них 80 - женщин в возрасте от 18 до 59 лет (37,3 $\pm$ 12,8 лет) и 23 - мужчины в возрасте от 18 до 60 лет (37,9 $\pm$ 13,8 лет).

Критерии включения в группу больных бронхиальной астмой в сочетании с хроническим описторхозом:

- положительные аллергопробы с 1 и более аэроаллергенами;
- пациенты, имеющие ранее подтвержденный диагноз бронхиальной астмы;
- документированные сведения об обратимости обструкции при проведении пробы с b2-агонистом >15%;
- наличие подтвержденного ранее синдрома атопии (отягощенный семейный atopический анамнез, уровень IgE сыворотки >100 МЕ/мл, положительные результаты скарификационного алерготестирования);
- наличие данных исследования функции внешнего дыхания по результатам спирографии и профокационного теста с метахолином (при отсутствии противопоказаний);
- пациенты, имеющие ранее подтвержденный или впервые выявленный диагноз хронического описторхоза;
- положительные результаты анализов на описторхоз (обнаружение яиц описторхисов в фекалиях и/или дуоденальном содержимом и/или положительный результат при проведении ПЦР-тестирования);
- пациенты, не получавшие антигельминтную терапию в отношении описторхоза в течение 5 лет до включения в исследование.

Выборку больных БА на фоне описторхоза составили 100 индивидов, средний возраст  $\pm$ S.D. которых был 44,3 $\pm$ 12,7, из них 84 женщины, средний возраст  $\pm$ S.D. которых составил 44,9 $\pm$ 12,7 года и 16 мужчин средний возраст  $\pm$ S.D. - 41,1 $\pm$ 10,7 лет. Критерии включения в группу здоровых индивидов:

- уровень IgE <100 МЕ/мл
- отсутствие клинических проявлений аллергических заболеваний на момент обследования и в анамнезе;
- отрицательные результаты анализов на описторхоз (обнаружение яиц описторхисов в фекалиях и/или дуоденальном содержимом и/или отрицательный результат при проведении ПЦР-тестирования).

Группу здоровых составили 126 индивидов, средний возраст  $\pm$ S.D. которых был 32,0 $\pm$ 11,2, из них 106 женщин, средний возраст  $\pm$ S.D. которых составил 31,7 $\pm$ 11,2 года и 20 мужчин средний возраст  $\pm$ S.D. - 34,0 $\pm$ 11,4 лет.

Критерии исключения для всех групп:

- несогласие индивида участвовать в исследовании;
- больные другими заболеваниями бронхо-легочной системы: хроническая обструктивная болезнь легких, дефицит  $\alpha$ 1-антитрипсина, бронхэктатическая болезнь, буллезная эмфизема легких, кисты легких (по данным анамнеза);
- больные с тяжелой сопутствующей патологией в стадии декомпенсации, которые, по мнению исследователя, могут повлиять на результаты исследования;
- наличие психических заболеваний;
- потенциальная опасность от проведения функциональных тестов и инструментального обследования (по мнению врача исследователя);
- длительная (с общей продолжительностью всех эпизодов не менее 1 мес) терапия системными кортикостероидами в любой дозе в течение 6 мес перед включением в исследование и в любое время в течение исследования.

Гены, предложенные для генотипирования, кодируют внутриклеточные сигнальные молекулы, включенные в негативную регуляцию цитокиновой сети [7]. Продукты указанных генов вовлечены в функциональные взаимоотношения, являясь важными звеньями цитокиновой сети, фенотипический результат работы которой зависит как от степени экспрессии генов, определяемой, в частности, их полиморфизмом, так и от средового контекста, в котором эта экспрессия осуществляется.

Формирование панели однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs), выбранных для исследования генов, производилось с использованием генетических баз данных, доступных в Интернете:

- Esemble Human GeneView <http://www.ensembl.org/Homosapiens/>
- NCBI SNPs-DataBase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>
- GeneCards database <http://www.genecards.org/index.shtml>

Для оценки возможного влияния SNPs на уровень генной экспрессии использовали данные программы «mRNA by SNP browser 1.0», доступной on-line (<http://www.sph.umich.edu/csg/liang/asthma>; Dixon A. et al., 2007). Для выбора полиморфизмов в промоторной области генов дополнительно использовали программный комплекс SNPselector (<http://snpselector.duhs.duke.edu/hqsnp36.html>) и FASTSNP (<http://fastsnp.ibms.sinica.edu.tw>). Основными критериями при выборе SNPs являлись: высокий уровень гетерозиготности полиморфизмов, их предполагаемая или доказанная функциональная значимость (неконсервативные аминокислотные замены, влияние на уровень экспрессии), наличие информации о включенности полиморфизмов в известные гаплотипы.

Для генотипирования индивидов по указанным полиморфным вариантам использовали ДНК, выделенную из цельной венозной крови по стандартной методике фенол-хлороформной экстракции [8]. К 0,7 мл крови, стабилизированной ЭДТА (0,1 мл 0,5М раствора ЭДТА на 1 мл крови), в микропробирки типа «эппендорф» добавляли 0,8 мл SSC, перемешивали, затем центрифугировали в течение 2 минут при 12000-13000 об/мин, после чего осторожно выливали супернатант. К осадку добавляли 1,4 мл SSC и сильно встряхивали, чтобы разбить осадок, после чего снова центрифугировали при 12000-13000 об/мин, в течение 2 минут. После центрифугирования супернатант удаляли и последнюю каплю снимали фильтровальной бумагой. К осадку добавляли 270 мкл 0,2М натрия ацетата (pH 7,0), тщательно и долго перемешивали, встряхивали до полной гомогенизации на протяжении 6-10 минут. К содержимому добавляли 30 мкл SDS, перемешивали и оставляли на 1 час в термостате при температуре 37°C, периодически перемешивая. Затем добавляли фенол-хлороформ (в соотношении 1:1) в равном объеме (примерно 300 мкл) и плавно перемешивали в течение 8-10 минут, после чего центрифугировали при 13000 об/мин 8 минут. После центрифугирования водную фазу (осторожно, не захватывая интерфазу) переносили в чистую пробирку эппендорф. К супернатанту в чистой пробирке эппендорф добавляли 1 мл 96% этилового спирта комнатной температуры, затем встряхивали для осаждения ДНК, после этого вращали пробирки для закручивания ДНК в комочек. Затем центрифугировали в течение 2 минут при 12000 об/мин, чтобы комочек ДНК приклеился ко дну пробирки, после чего осторожно удаляли спирт. На следующем этапе добавляли 1 мл 70% этилового спирта, перемешивали, после чего центрифугировали при аналогичных условиях, затем спирт удаляли. ДНК подсушивали на воздухе в течение 5-10 минут, добавляли 50 мкл деионизированной воды и оставляли на ночь для полного растворения ДНК. Выделенную ДНК замораживали и хранили при -20°C до проведения эксперимента. Генотипирование осуществляли с помощью анализа полиморфизма длин рестриционных фрагментов.

ПЦР для гена IL4RA проводили с использованием структуры праймеров, представленных в литературе [9], для генов IFNG, IFNGR2, PIASY, PIAS3, SOCS5, STAT5B, IL4, GAT A3, TBX21 структура праймеров подобрана самостоятельно. Дизайн олигонуклеотидных праймеров выполнен с помощью программы Primer3 в соответствии с последовательностью исследуемых генов, приведенной в

международных базах данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>), GeneCards (<http://www.genecards.org/>), Ensembl (<http://www.ensembl.org>). Проверку на наличие в нуклеотидных последовательностях сайтов неспецифической гомологии для выбранных праймеров проводили с использованием поисковой системы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>, NCBI, США).

Для проведения ПЦР готовили реакционную смесь: 2,5 пмоль специфических праймеров, 2 ммоль каждого dNTP, 1,2 мл 10x реакционного буфера, 1,5 ммоль MgCl<sub>2</sub>, 0,5 Ед Таq ДНК-полимеразы (SibEnzyme, Россия), 100-200 нг геномной ДНК. Смесь помещали в 0,5 мл пробирки типа «Эппендорф», наслаивали сверху минеральное масло для предотвращения испарения и амплифицировали в автоматических минициклерах 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) и ТП4-ПЦР-01-Терцик (ДНК-Технология).

Программа амплификации включала предварительную денатурацию при 95°C в течение 3 минут, с последующими 30-35 циклами отжига при температуре соответствующей пары праймеров 60-64°C (40 сек), элонгации цепи при 72°C (50 сек) и денатурации при 95°C (20 сек). Программу завершала финальная элонгация при 72°C в течение 3 минут. Амплификат подвергали гидролизу соответствующей рестриктазой при оптимальной для фермента температуре на протяжении 12-24 ч. Рестрикционная смесь включала 5-7 мкл амплификата, 1,0-1,2 мкл 10x буфера для рестрикции, поставляемого фирмой - производителем («Сибэнзим», Новосибирск; NEB, Великобритания), и 1-5 единиц активности фермента (в зависимости от эффективности его работы). Для генотипирования полиморфизма IL4RA анализ длин рестрикционных фрагментов осуществляли в 4% агарозном геле, для IL4-V полиакриламидном геле (7%), для других полиморфных вариантов - в 3% агарозном геле. Фрагменты ДНК окрашивали бромистым этидием и визуализировали в ультрафиолетовом свете с применением компьютерной видеосъемки на приборе «UV-VIS Imager-П» (США).

С помощью метода MB-MDR проведен анализ межгенных и генно-средовых взаимодействий в отношении риска аллергических заболеваний и признаков. Расчеты включают три этапа. На первом этапе выполняется тест на ассоциацию мультилокусных комбинаций с фенотипом. Для бинарных или мультиномиальных признаков используется логистическая регрессия, для количественных - линейная регрессия. По результатам анализа ассоциаций, каждой генотипической (или генотип-средовой) комбинации присваивается категория риска: высокий риск (High), низкий риск (Low) или нет риска (0). При этом используется либеральный уровень значимости 0,1.

На втором этапе мультилокусные и генотип-средовые комбинации одной группы риска High или Low) объединяются и используются для анализа ассоциаций с фенотипом. В каждом тесте одна группа риска сравнивается с двумя другими, то есть, группа High с комбинацией Low и 0, а группа Low с комбинацией High и 0. Результатом расчетов являются статистики Вальда для каждой из категорий риска и соответствующие им уровни значимости ассоциации. На этом шаге выявляются несколько комбинаций с высоким или низким риском в отношении исследуемого фенотипа. Дальнейшему анализу могут быть подвергнуты комбинации с выбранным исследователем уровнем значимости. Нами протестированы двух-, трех- и четырехуровневые комбинации. Для двухуровневых комбинаций далее анализировали модели с величиной  $p \leq 0,01$ , для трехуровневых - с  $p < 0,001$ , для четырехуровневых - с  $p \leq 0,00001$ .

На третьем этапе для каждой тестируемой комбинации выбирается вариант, соответствующий максимальному значению статистики Вальда и затем определяется экспериментальный уровень значимости с помощью пермутационного теста. Для двух- и трехкомпонентных моделей уровень статистической значимости принимали  $p < 0,05$ , для четырехкомпонентных моделей -  $p \leq 0,01$ .

Итогом расчетов является комбинация генотипов и факторов среды, связанная с высоким или низким риском развития заболевания или с высоким или низким уровнем количественного признака. Дополнительно для качественных переменных проведены расчеты чувствительности, специфичности и показателя AUC (area under curve, средняя арифметическая чувствительности и специфичности) диагностической модели, установленной с помощью MB-MDR.

Для БА идентифицировано 5 статистически значимых двухфакторных моделей, 14 - трехфакторных и 2 - четырехфакторных (табл.2). Описторхозная инвазия входит в 7 моделей, причем в 6 случаях - в сочетании с геном SOCS5. В зависимости от сочетаний с генотипами модели с описторхозом связаны как с высоким, так и с низким риском БА. Аналогично, одни и те же генотипы могут входить в модели разной направленности (высокого или низкого риска) в зависимости от сочетания с другими генотипами, то есть, от генетического окружения.

Судя по величине AUC, модели SOCS5 / IFNG / OPI и IL4 / TBX21 / SOCS5 являются наиболее ценными для диагностики высокого и низкого риска БА. В целом значения

AUC для всех моделей довольно низкие (0,53-0,61), свидетельствуя о невысоком диагностическом потенциале полученных моделей. Основная проблема заключается в низкой специфичности, что означает, что при использовании моделей в диагностических целях уровень выявления истинно положительных случаев БА невысок - 48% для наилучшей модели. В то же время, для этих моделей получены большие значения специфичности, то есть при их использовании в диагностических целях можно ожидать эффективного определения лиц без БА.

Таким образом, проведенный анализ межгенных и генно-средовых взаимодействий с помощью подхода MDR позволил выявить сочетания, маркирующие высокий и низкий риск бронхиальной астмы. Следует отметить несколько важных обстоятельств. Во-первых, очевидно, что в ряде случаев одни и те же генотипы или значения средового фактора (описторхозная инвазия) могут входить в сочетания высокого и низкого риска в зависимости от состава генотипов других генов. Это свидетельствует о важности генного окружения в реализации генотип-фенотипических связей в развитии аллергий. Во-вторых, описторхоз входит в состав значительного числа полученных моделей, что демонстрирует важность этой гельминтной инвазии в модификации развития аллергий на предрасполагающем генетическом фоне, связанном с исследованными генами. В-третьих, количество статистически значимых MDR моделей существенно превышает количество статистически значимых ассоциаций между генами и аллергическими заболеваниями и признаками. Это свидетельствует о существенно более высокой мощности метода MDR для выявления взаимоотношений между генотипами и фенотипами.

Примеры выполнения способа

Пример 1

Больной П., 42 года.

Обратился к терапевту с жалобами на заложенность носа, обильное серозное отделяемое из носа, данные симптомы беспокоят в течение последних 6 месяцев. Периодически применяет деконгестанты (Називин 0,05% капли в нос по 1 капле в каждый носовой ход 2-3 раза в день).

Из анамнеза выяснено, что мать и сестра больного страдают бронхиальной астмой.

У пациента заподозрен аллергический ринит и параллельно со стандартным обследованием, в связи с отягощенным семейным анамнезом по астме, был оценен риск развития бронхиальной астмы согласно предлагаемому способу. Пациенту была проведена диагностика описторхоза и генотипирование с определением полиморфных вариантов генов интерлейкина 4 (IL4, rs2070874), гена, кодирующего транскрипционный фактор T-bet 21 (TBX21, rs 11652969), гена супрессора цитокинового сигнала 5 (SOCS5, rs6737848), гена интерферона гамма (IFNG, rs2069705).

В результате обследования у пациента выявлен описторхоз (трехкратная копроовоскопия) и следующее сочетание полиморфных вариантов исследованных генов: IL4 - C/T, TBX21 - G/G, SOCS5 - G/C, IFNG - C/C.

Прогноз?

По модели SOCS5/IFNG/OPI пациент соответствует комбинации G/C-C/C-1 и относится к группе высокого риска бронхиальной астмы.

Дальнейшее обследование на данном этапе позволило диагностировать у пациента персистирующий аллергический ринит и хронический описторхоз, латентное течение.

Объективный статус: Рост: 172 см, вес 78 кг, АД: 123/82 мм рт.ст., ЧСС: 68 уд.мин.

Общее состояние удовлетворительное, положение активное, сознание ясное.

Кожные покровы обычной окраски, влажные. Носовое дыхание затруднено. Периферические лимфоузлы не увеличены. При осмотре грудная клетка цилиндрическая. Частота дыхания составляет 16 в минуту, при аускультации дыхание везикулярное, хрипы не выслушиваются. При осмотре области сердца видимых патологических изменений нет. Тоны сердца приглушены, ритмичные. При пальпации живот мягкий, безболезненный. Печень и селезенка не увеличены. Пузырные симптомы отрицательные. Симптом поколачивания отрицательный с обеих сторон. Дизурических явлений и периферических отеков нет.

Атопический статус: Уровень общего IgE в сыворотке крови (от 13.04.2010 г.) составил 338,8 МЕ/мл.

Спирография (от 15.04.2010): ОФВ1 - 82,3% от должных значений, что соответствует норме.

Осмотр ЛОР-врача: аллергический ринит.

Клинический диагноз

Основной: Персистирующий аллергический ринит, средней степени тяжести.

Сопутствующий: Хронический описторхоз, латентное течение.

По поводу аллергического ринита пациенту назначены топические стероиды: Фликсоназе 50 мкг по 2 ингаляции в каждый носовой ход 2 раза в день в течение двух недель, затем переход на использование препарата в той же дозе 1 раз в день. В связи с диагностированным высоким риском развития бронхиальной астмы пациенту рекомендовано соблюдение гипоаллергенного быта. Повторный визит назначен через



1 месяц. Дегельминтизация по поводу описторхоза отложена до купирования симптомов ринита.

Через 1 месяц от начала использования базисной терапии отмечена положительная динамика: на момент осмотра отделяемого из носа нет, сохраняется затруднение дыхания за счет отека слизистой. Пациент переведен на использование поддерживающей дозы: Фликсоназе 50 мкг по 1 ингаляции в каждый носовой ход 1 раз в день. Повторный визит назначен через 3 месяца.

Повторный визит через 4 месяца от первичного осмотра.

Пациент предъявляет жалобы на сухой кашель, одышку при физической нагрузке, чувство заложенности в грудной клетке 3-4 раза в неделю, ночных пробуждений нет. Из анамнеза выяснено, что впервые данные симптомы появились около месяца назад после того, как пациент прибирал старые пыльные вещи на даче. После контакта с пылью возникло чувство нехватки воздуха и свистящие дистанционные хрипы. Сохраняется незначительная заложенность носа.

Объективный статус: Рост: 172 см, вес 78 кг, АД: 128/78 мм рт.ст., ЧСС: 74 уд.мин.

Общее состояние ближе к удовлетворительному, положение активное, сознание ясное. Кожные покровы обычной окраски, влажные. Носовое дыхание затруднено. Периферические лимфоузлы не увеличены. При осмотре грудная клетка цилиндрическая. Частота дыхания составляет 19 в минуту, при аускультации дыхание жесткое, выдох удлиннен, по задней поверхности легких выслушиваются высокие сухие свистящие хрипы на выдохе. При осмотре области сердца видимых патологических изменений нет. Тоны сердца приглушены, ритмичные. При пальпации живот мягкий, безболезненный. Печень и селезенка не увеличены. Пузырные симптомы отрицательные. Симптом поколачивания отрицательный с обеих сторон. Дизурических явлений и периферических отеков нет.

Спирография (от 03.08.2010): ОФВ1 - 68,4% от должных значений, что соответствует бронхиальной обструкции II степени. Тест на обратимость бронхиальной обструкции положительный - прирост ОФВ1 в пробе с сальбутамолом составил 22,4%. В связи с низкими исходными показателями ОФВ1 тест на бронхиальную гиперреактивность пациенту не проводился.

Рентгенография органов грудной клетки (от 03.08.2010): патологических изменений не выявлено.

На основании дообследования установлен диагноз:

Клинический диагноз

Основной: Бронхиальная астма, атопическая, персистирующая, средней степени тяжести. ВН II степени по обструктивному типу.

Сопутствующий: Персистирующий аллергический ринит, средней степени тяжести.

Хронический описторхоз, латентное течение.

Таким образом, прогноз оказался верным, у пациента манифестировала бронхиальная астма. Пациенту назначена базисная терапия астмы: Серетид ДАИ 25/125 мкг по 2 дозы 2 раза в день.

Пример 2

Больная К., 21 год.

Обратилась к пульмонологу с жалобами на сухой кашель в течение последнего месяца, одышку при выполнении физической нагрузки.

Из анамнеза выяснено, что около месяца назад перенесла ОРЗ: фарингит, трахеобронхит. Лечилась у терапевта, после купирования основных симптомов сохраняются вышеперечисленные жалобы в течение месяца. Со слов больной, у отца - хронический бронхит.

С учетом жалоб и отягощенного анамнеза по бронхо-легочной патологии пациентка была дообследована согласно предложенному способу для определения риска развития бронхиальной астмы. Параллельно со стандартным обследованием пациентке была проведена диагностика описторхоза и генотипирование с определением полиморфных вариантов генов IL4, TBX21, SOCS5 и IFNG для определения риска возникновения астмы.

В результате обследования у пациентки описторхоз не выявлен (трехкратная копроовоскопия), обнаружено следующее сочетание полиморфных вариантов исследованных генов: IL4 - C/C, TBX21 - G/A, SOCS5 - G/C, IFNG - T/C.

Прогноз?

По модели SOCS5/IFNG/OPI пациентка соответствует комбинации G/C-T/C-0 и не относится к группе высокого риска развития бронхиальной астмы, по модели IL4/TBX21/SOCS5 пациентка соответствует комбинации C/C-G/A-G/C и относится к группе с низким риском развития астмы.

Объективный статус: Рост: 164 см, вес 57 кг, АД: 110/68 мм рт.ст., ЧСС: 72 уд.мин.

Общее состояние удовлетворительное, положение активное, сознание ясное. Кожные покровы обычной окраски, влажные. Периферические лимфоузлы не увеличены. При осмотре грудная клетка цилиндрическая, перкуторный звук легочный, одинаковый на симметричных участках. Частота дыхания составляет 15 в

минуту, при аускультации дыхание везикулярное, хрипы не выслушиваются. При осмотре области сердца видимых патологических изменений нет. Тоны сердца ясные, ритмичные. При пальпации живот мягкий, безболезненный. Печень и селезенка не увеличены. Пузырные симптомы отрицательные. Симптом поколачивания отрицательный с обеих сторон. Физиологические отклонения в норме.

Атопический статус: Уровень общего IgE в сыворотке крови (от 23.05.2010 г.) составил 42,3 МЕ/мл.

Рентгенография органов грудной клетки (от 23.05.2010): патологических изменений не выявлено.

Проба Манту - 0,5 мм (норма).

Спирография (от 25.05.2010): ОФВ1 - 104,1% от должных значений, что соответствует норме. Тест на бронхиальную гиперреактивность с метахолином - 8 мг/мл - слабоположительный.

Таким образом, у пациентки в настоящее время не достаточно данных для диагностики бронхиальной астмы, однако имеет место слабоположительный тест на бронхиальную гиперреактивность. Клинический диагноз: Остаточные явления после перенесенного трахеобронхита.

Больной назначена следующая неспецифическая терапия: Синекод по 1 таблетке 2 раза в день, физиотерапия - СМТ на корни легких, массаж грудной клетки. Повторная консультация через 1 месяц.

Повторный визит через 1 месяц.

Пациентка жалоб не предъявляет. Чувствует себя удовлетворительно. При объективном осмотре отклонений от нормы не выявлено.

Спирография (от 01.07.2010): ОФВ1 - 106,4% от должных значений, что соответствует норме. Тест на бронхиальную гиперреактивность с метахолином - 16 мг/мл - отрицательный.

Заключение: пациентка здорова.

Прогноз оказался верным, пациентка отнесена к группе с низким риском развития бронхиальной астмы.

Таким образом, предлагаемый способ позволяет прогнозировать высокий и низкий риск бронхиальной астмы с учетом описторхозной инвазии. Его использование в регионах с высокой и низкой распространенностью гельминтных инфекций поможет более эффективно и качественно решать задачи по прогнозированию и профилактике бронхиальной астмы.

Источники информации

1. Strachan, D.P. Hay fever, hygiene, and household size // *BM.T* - 1989 Nov 18;299(6710):1259-1260.

2. Евдокимова, Т.А. Влияние хронической описторхозной инвазии на клиническое течение и иммунный ответ при атопической бронхиальной астме у детей / Евдокимова Т.А., Огородова Л.М. // *Педиатрия*. 2005. №6. С.12-14.

3. Патент RU№2324937, 20.05.2008, «Способ прогнозирования бронхиальной астмы»

4. Патент EP 1954810, 13.08.2008, «Genetic variants of human inositol polyphosphates-phosphatase, type I (INPP4A) useful for prediction and therapy of immunological disorders»

5. Патент RU №2383019, 27.02.2010 «Способ прогнозирования риска развития бронхиальной астмы»

6. Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer / Ritchie M.D. et al. // *Am J Hum Genet* -2001 Jul;69(1):138-147

7. Regulation of innate immunity by suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins / A.Dalpe, K.Heeg, H.Bartz, A.Baetz // *Immunobiology*. - 2008. - Vol.213. - P.225-235.

8. A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested / Lahiri DK, Bye S, Nurnberger JJ Jr et al. // *J Biochem Biophys Methods* - 1992 Dec;25(4):193-205.

9. Ile50Val variant of IL4R alpha upregulates IgE synthesis and associates with atopic asthma. / Mitsuyasu H, Izuhara K, Mao XQ et al. // *Nat Genet* - 1998 Jun; 19(2): 119-120.

Приложение

Таблица 1. Характеристика исследованных полиморфизмов

Таблица 2. Статистически значимые MDR-модели для бронхиальной астмы

Примечание. Здесь и далее: OPI - описторхозная инвазия (0 - нет, 1 - есть); High - модель высокого риска; Low - модель низкого риска (протективные сочетания); OR - отношение шансов для указанной совокупности сочетаний; SE - чувствительность; SP - специфичность; AUC - показатель Area Under Curve, средняя арифметическая значений SE и SP, показатель диагностической ценности модели; P<sub>перм.</sub> - достигнутый уровень значимости модели, рассчитанные путем пермутаций. Жирным шрифтом выделены модели с наибольшей величиной AUC для моделей высокого и низкого риска.

Ген	Хромосомная локализация	Полиморфизм	Локализация в гене	Фермент рестрикции
IL4	5q31.1	rs2070874	5'UTR	BstMAI
IFNG	12q14	rs2069705	промотор	HpaI
IL4RA	16p12.1	rs1805010	экзон	RsaI
IFNGR2	21q22.11	rs17880053	промотор	Msp20I
GAT A3	10p15	rs10905277	5'UTR	RsaI
TBX21	17q21.32	rs11652969	интрон	BstPI I
PIAS3	1q21	rs12756687	интрон	Bst2U I
PIASY	19p13.3	rs3760903	интрон	Bst4C I
STAT5 p	17q1 1.2	rs16967593	интрон	AatH
SOCS5	2p21	rs6737848	интрон	BstDE I

Таблица 2

Модель	Предикторные сочетания		OR	SE	SP	AUC	P <sub>перм.</sub>
	Сочетания	Тип					
SOCS5/OPI	C/G - 0	Low	0,29	0,13	0,96	0,54	0,009
PIAS3/GATA3	C/C - A/G	High	3,74	0,16	0,95	0,56	0,012
TBX21/IFNGR2	G/A - del/G	High	2,69	0,15	0,94	0,54	0,029
GATA3/STAT5B	G/G - A/T	Low	0,34	0,14	0,95	0,54	0,037
PIAS3/IL4	C/C - C/T	High	4,05	0,09	0,98	0,53	0,046
SOCS5/IFNG/	C/C - T/C - 0	High	2,55	0,48	0,73	0,61	0,002
OPI	G/C - C/C - 1						
	C/C - T/T - 1						
IL4/TBX21/	C/T - G/G - C/C	Low	0,36	0,28	0,87	0,58	0,002
SOCS5	C/T - G/A - C/C						
	C/T - A/A - C/C						
	C/C - G/A - G/C						
GATA3/SOCS5/	G/G - G/C - 0	Low	0,14	0,11	0,98	0,55	0,006
OPI	A/G - G/C - 0	High	6,39	0,15	0,97	0,56	0,012
PIAS3/GATA3/	C/C - A/G - T/C						
IFNG	C/C - A/G - T/T						
STAT5B/TBX21/	T/T-G/G-del/del	High	2,41	0,34	0,83	0,58	0,016
IFNGR2	T/T - G/A - del/G						
	A/T - G/A - del/G						
PIAS3/TBX21/	C/C - G/G - del/del	High	3,88	0,15	0,96	0,55	0,020
IFNGR2	G/C - G/G - del/G						

	G/C - G/A - del/G	High	2,73	0,07	0,97	0,52	0,024
IL4/PIAS4/	C/T-A/A-G/A						
TBX21		Low	0,23	0,12	0,97	0,54	0,024
TBX21/SOCS5/	G/G - G/C - 0						
OPI	G/A - G/C - 0						
PIAS4/TBX21/	A/A - G/G - del/del	High	2,64	0,27	0,88	0,57	0,030
IFNGR2	G/G - A/A - del/del						
	A/G - G/A - del/G						
	A/A - G/A - del/G	High	2,45	0,10	0,96	0,53	0,036
PIAS3/SOCS5/	C/C - C/C - 0						
OPI							
PIAS3/IL4/	C/C-C/T - 0	High	4,05	0,09	0,98	0,53	0,042
OPI	C/C-C/T - 1						
PIAS3/GATA3/	C/C - A/G - del/del	High	6,28	0,12	0,98	0,55	0,044
IFNGR2							
PIAS3/GATA3/	C/C - A/G - C/C	High	3,33	0,14	0,95	0,55	0,044
SOCS5							
IL4/SOCS5/	C/C - G/C - 0	Low	0,16	0,09	0,99	0,54	0,044
OPI							
IFNGR2/SOCS5/	del/del - C/C T/C - 0	High	2,54	0,28	0,87	0,57	0,002
IFNG/OPI	del/G - C/C - T/T - 1						
IL4/PIAS4/	C/T - A/A - G/A - del/	High	4,52	0,15	0,96	0,56	0,008
TBX21/IFNGR2	del						
	C/T-A/G-G/A-del/G						
	C/C - A/A - G/A - del/G						

Формула изобретения

Способ прогнозирования индивидуального риска развития бронхиальной астмы в

регионах с высокой и низкой распространенностью гельминтных инфекций, при котором определяют факт наличия, либо отсутствия описторхоза, определяют полиморфные варианты генов и определяют вероятность отнесения индивида к группе с низким риском развития бронхиальной астмы или высоким риском развития бронхиальной астмы, причем определяют полиморфные варианты генов интерлейкина-4 (IL4), гена, кодирующего транскрипционный фактор T-bet 21 (TBX21), гена супрессора цитокинового сигнала 5 (SOCS5), гена интерферона-гамма (IFNG), и при обнаружении у пациента одной из комбинаций риска в соответствии с моделью SOCS5/IFNG/OPI:

C/C - T/C - 0, либо G/C - C/C - 1, либо C/C - T/T - 1,

где SOCS5 - генотипы SOCS5 (rs6737848): C/C, G/C,

IFNG - генотипы IFNG (rs2069705) T/C, C/C, T/T,

OPI - описторхоз, обозначаемый при его наличии - 1, при его отсутствии - 0,

у пациента диагностируют высокий риск развития бронхиальной астмы, в случае обнаружения у пациента одной из протективных комбинаций в соответствии с моделью IL4/TBX21/SOCS5

C/T - G/G - C/C, либо C/T - G/A - C/C, либо C/T - A/A - C/C, либо C/C - G/A - G/C

где IL4- генотипы IL4 (rs2070874): C/T, C/C;

TBX21 - генотипы TBX21 (rs11652969): G/G, G/A, A/A;

SOCS5 - генотипы SOCS5 (rs6737848): C/C, G/C

у пациента диагностируют низкий риск развития бронхиальной астмы.