



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/582 (2024.01); C12Q 1/6806 (2024.01); C12Q 1/6827 (2024.01); C12Q 1/686 (2024.01); C12Q 1/6876 (2024.01); C12Q 1/6883 (2024.01)

(21)(22) Заявка: 2023131265, 29.11.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.11.2023

Дата регистрации:

16.05.2024

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 29.11.2023

(45) Опубликовано: 16.05.2024 Бюл. № 14

Адрес для переписки:

308015, г.Белгород, ул. Победы, 85, НИУ
"БелГУ", Токтарева Татьяна Михайловна

(72) Автор(ы):

Рашина Ольга Викторовна (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: RU 2563828 C1, 20.09.2015.РАШИНА О.В. и др. Генетические факторы
риска развития Н. рѹлогі-позитивной язвенной
болезни желудка. Доказательная
гастроэнтерология. 2023; 12(1): 14-20. Принята
к печати 18.01.2023. РАШИНА О.В. и др.
Вклад межгенных взаимодействий
полиморфных вариантов генов-кандидатов в
развитие язвенной болезни желудка. (см.
прод.)(54) Способ прогнозирования риска развития язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки у
мужчин на основе молекулярно-генетического тестирования

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к медицинской диагностике, и может быть использовано для прогнозирования риска развития язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки у мужчин русской национальности. Из лейкоцитов периферической венозной крови выделяют ДНК. Проводят анализ полиморфных локусов rs505922 ABO, rs8176720 ABO и rs6136 SELP. При выявлении комбинации полиморфных локусов rs505922 ABO TC ×

rs8176720 ABO CC × rs6136 SELP AC прогнозируют высокий риск развития язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. Способ обеспечивает получение новых критериев оценки риска развития язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки у мужчин русской национальности на основе данных о комбинации полиморфных локусов rs505922 ABO TC × rs8176720 ABO CC × rs6136 SELP AC. 3 ил., 4 пр.

(56) (продолжение):

Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2022; 207 (11): 102-109. TANIKAWA C. et al. Impact of PSCA variation on gastric ulcer susceptibility. PLoS One. 2013 May 21; 8 (5): e63698.



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 33/582 (2024.01); *C12Q 1/6806* (2024.01); *C12Q 1/6827* (2024.01); *C12Q 1/686* (2024.01); *C12Q 1/6876* (2024.01); *C12Q 1/6883* (2024.01)

(21)(22) Application: **2023131265, 29.11.2023**

(24) Effective date for property rights:
29.11.2023

Registration date:
16.05.2024

Priority:

(22) Date of filing: **29.11.2023**

(45) Date of publication: **16.05.2024** Bull. № 14

Mail address:

**308015, g.Belgorod, ul. Pobedy, 85, NIU "BelGU",
Toktareva Tatyana Mikhailovna**

(72) Inventor(s):

**Rashina Olga Viktorovna (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 FOR PREDICTION OF RISK OF DEVELOPING GASTRIC AND DUODENAL ULCER IN MALES BASED ON MOLECULAR GENETIC TESTING**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine, namely to medical diagnostics, and can be used to predict the risk of developing gastric ulcer and duodenal ulcer in Russian men. DNA is recovered from peripheral venous blood leukocytes. Analysis of polymorphic loci rs505922 ABO, rs8176720 ABO and rs6136 SELP. When detecting a combination of polymorphic loci rs505922 ABO TC × rs8176720 ABO CC × rs6136

SELP AC, high risk of developing gastric ulcer and duodenal ulcer is predicted.

EFFECT: method provides obtaining new criteria for assessing the risk of developing gastric ulcer and duodenal ulcer in Russian males based on data on a combination of polymorphic loci rs505922 ABO TC × rs8176720 ABO CC × rs6136 SELP AC.

1 cl, 3 dwg, 4 ex

RU 2 819 282 C1

RU 2 819 282 C1

Изобретение относится к области медицинской диагностики и может быть использовано для прогнозирования риска развития язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки у мужчин на основе молекулярно-генетического тестирования.

5 Язвенная болезнь (ЯБ) желудка и двенадцатиперстной кишки - хроническое рецидивирующее заболевание, характерным признаком которого в период обострения является образование язв слизистой оболочки желудка и/или двенадцатиперстной кишки (Моисеев В.С. и др., 2018). Мужчины страдают ЯБ в 2-7 раз чаще, чем женщины (Ивашкин В.Т. и др., 2016, 2020). Такое различие, вероятно, связано с уровнем половых
10 гормонов, значимых во всех процессах, происходящих в организме, в том числе в процессах, имеющих важное патогенетическое значение для развития ЯБ (воспаление, иммунный ответ и др.) (Липатова Т.Е. и др., 2020). Эстроген оказывает протективное действие в отношении слизистой оболочки желудка и ДПК, благодаря чему мужчины более подвержены развитию заболевания, чем женщины, однако с наступлением у
15 женщин менопаузы эти различия нивелируются. Недостаток эстрогенов также подавляет гуморальный иммунитет, что облегчает внедрение *H. pylori* и запуск язвообразования. В то же время половые гормоны могут иметь отношение к развитию эндотелиальной дисфункции за счет изменения уровня и биодоступности оксида азота, а также участию в продукции бикарбонатов и в общих адаптационных и приспособительных реакциях
20 организма (Липатова Т.Е. и др., 2020; Radulovic P. et al., 2012).

По данным полногеномного исследования, проведенного в Японии, полиморфный локус rs505922 ABO играет роль в развитии ЯБ ДПК (аллель T, OR=1,32, $p=1,15 \times 10^{-10}$) (Tanikawa S. et al., 2012). Ген ABO кодирует гликозилтрансферазу, которая катализирует
25 перенос углеводов на антиген H. При переносе N-ацетилгалактозамина на антиген H образуется антиген A (II группа крови), при переносе галактозы - антиген B (III группа крови). У лиц с группой крови O (I группа крови) происходит сдвиг рамки считывания за счет делеции гуанина в положении 258, что приводит к трансляции совершенно
30 другого белка и отсутствию продукции антигенов A и B (<https://www.genecards.org>, <https://www.omim.org>).

Полиморфный локус rs8176720 ABO влияет на уровень E-селектина ($p=6 \times 10^{-13}$), который играет роль в снижении скорости движения лейкоцитов в кровеносных сосудах для последующего прикрепления к эндотелию и миграции к очагу воспаления (Жерносеков Д.Д., 2007; Болдырева О.Н., 2012; Гилязова Г.И. и др., 2012; Galustian S.
35 et al., 2003; Barbalic M. et al., 2010).

По данным GWAS, полиморфный локус rs6136 SELP ассоциирован с уровнем P-селектина (Barbalic M. et al., 2010; Suhre K. et al., 2017; Sun B.B. et al., 2018), который участвует в развитии воспалительного процесса. Белковый продукт гена SELP (P-селектин) относится к молекулам клеточной адгезии, находится в альфа-гранулах
40 тромбоцитов и тельцах Вейбеля-Паладе эндотелиальных клеток, является кальций-зависимым рецептором миелоидных клеток, опосредует взаимодействие активированных эндотелиальных клеток или тромбоцитов с лейкоцитами, участвует в развитии воспаления (<https://www.genecards.org>, <https://www.omim.org>).

Для оценки сложившейся патентной ситуации был выполнен поиск по охраняемым документам за период с 1990 по 2021 гг. Источники информации: сайты Федерального
45 института промышленной собственности <http://fips.ru>.

В изученной научно-медицинской и доступной патентной литературе авторами не было обнаружено способа прогнозирования риска развития язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки у мужчин русской национальности, на основе данных о

комбинации полиморфных локусов rs505922 ABO TC × rs8176720 ABO CC × rs6136 SELP AC.

Известен способ прогнозирования риска развития и прогрессирования язвенной болезни по патенту РФ №2231794 (опубликован 27.06.2004), включающий исследования 5 желудочных проб, основанный на измерении скорости диффузии ионов водорода через слой слизи, покрывающей слизистой оболочки желудка, путем введения в желудок тестового 0,1 N раствора соляной кислоты и исследования динамики проникновения ионов водорода в слизистую оболочку путем эвакуации содержимого желудка, тем самым определяют риск развития язвенной болезни. Недостатком этого способа является 10 трудоемкость выполнения, которая заключается в многократной эвакуации содержимого желудка и введении в желудок большого количества соляной кислоты, сложность подсчетов, и кроме того не учитывается роль генетических полиморфизмов.

Патент РФ №2318217 (опубликован 27.02.2008), в котором описан способ и устройство для прогнозирования риска развития язвенной болезни. Сущность способа заключается 15 в том, что электрохимическим методом измеряют диффузионный (жидкостной) или мембранный потенциал между желудочным соком и тестовой жидкостью, и при величине потенциала более порогового уровня, установленного для тестовой жидкости, прогнозируют риск развития язвенной болезни. в качестве тестовой жидкости можно использовать воду. В этом случае пороговый уровень составляет 10 мв. одновременно 20 с измерением диффузионного или мембранного потенциала может быть измерен рН желудочного сока, при этом риск развития язвенной болезни прогнозируют при величине диффузионного или мембранного потенциала более порогового уровня, установленного для тестовой жидкости, и рН менее 1,5. Устройство для осуществления способа при исследовании желудочного сока *in vitro* состоит из двух емкостей, разделенных 25 диафрагмой: с желудочным соком и с тестовой жидкостью. В них опущены электроды сравнения, напряжение между которыми равно диффузионному потенциалу. устройство для исследования желудочного сока *in vivo* содержит камеру с тестовой жидкостью, через диафрагму, контактирующую с желудочным соком, и два электрода сравнения, один из которых контактирует с желудочным соком, а другой - с тестовой жидкостью. 30 Напряжение между электродами равно диффузионному потенциалу. использование способа позволяет своевременно начать профилактическое лечение язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. Недостатком этого способа является его трудоемкость, он не учитывает роль генетических полиморфизмов.

Патент РФ №2281037 (опубликован 10.08.2006), в котором описан способ 35 прогнозирования развития язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. Сущность способа заключается в том, что осуществляют определение календарного возраста пациента, биологического возраста, соотношение биологического и календарного возрастов, рост, массу тела, показатели качества жизни. Затем рассчитывают вероятность развития язвенной болезни по формуле:

$$40 \quad P_1 = \frac{e^{D1}}{e^{D1} + e^{D2}} \times 100\%$$

$$45 \quad P_2 = \frac{e^{D2}}{e^{D1} + e^{D2}} \times 100\%,$$

где e - экспонента, число оснований натурального логарифма, равное - 2,71, $D1$ - сумма показателей, умноженных на коэффициент B дискриминантных функций для больных, $D2$ - сумма показателей, умноженных на коэффициент A дискриминантных

функций для здоровых, при этом значения коэффициентов А и В выбирают из таблицы «Коэффициенты дискриминантных функций» и при $P1 > P2$ прогнозируют риск развития язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. Недостатком этого способа является то, что он не учитывает роль генетических полиморфизмов.

5 За прототип выбран патент РФ №2563828 от 20.09.2015 «Способ оценки риска развития язвенной болезни двенадцатиперстной кишки у хакасов на основе генетического анализа». Патент характеризуется тем, что устанавливают факторы риска - определяют полиморфизм интерлейкина IL-8 методом рестрикционного анализа при выделении ДНК из лимфоцитов венозной крови, а также определяют генотип
10 *Helicobacter pylori* методом ПЦР при выделении ДНК из биоптатов слизистой оболочки желудка у пациентов, относящихся к коренным жителям Республики Хакасия. Факторам риска присваивают числовые значения и затем определяют прогностические коэффициенты $P1, P2$. При $P1 > P2$ прогнозируют низкий риск, а при $P1 < P2$ прогнозируют высокий риск развития язвенной болезни. Недостатком данного метода является
15 трудоемкость подсчета и применим только для коренных жителей Республики Хакасия.

Задачей настоящего исследования является расширение арсенала методов диагностики, а именно создание способа прогнозирования риска развития язвенной болезни у мужчин на основе данных о комбинации полиморфных локусов rs505922 ABO TC × rs8176720 ABO CC × rs6136 SELP AC.

20 Технический результат использования изобретения - получение критериев оценки риска развития язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки у мужчин русской национальности, на основе данных о комбинации полиморфных локусов rs505922 ABO TC × rs8176720 ABO CC × rs6136 SELP AC, включающий:

- выделение ДНК из лейкоцитов периферической венозной крови мужчин;
- 25 - анализ полиморфных локусов rs505922 ABO, rs8176720 ABO, rs6136 SELP;
- прогнозирование высокого риска развития язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки у мужчин на основе данных о комбинации полиморфных локусов rs505922 ABO TC × rs8176720 ABO CC × rs6136 SELP AC.

Новизна и изобретательский уровень заключаются в том, что из уровня техники не
30 известна возможность прогноза развития язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки у мужчин с учетом молекулярно-генетического тестирования у индивидуумов русской национальности на основе данных о комбинации полиморфных локусов rs505922 ABO TC × rs8176720 ABO CC × rs6136 SELP AC.

Выделение геномной ДНК из периферической крови осуществляют методом
35 фенольно-хлороформной экстракции (Mathew, 1984) в два этапа. На первом этапе к 4 мл крови с ЭДТА добавляют 25 мл лизирующего буфера, содержащего 320мМ сахарозы, 1% тритон X-100, 5мМ MgCl₂, 10мМ трис-HCl (pH=7,6). Полученную смесь перемешивают и центрифугируют при 4°C, 4000 об./мин. в течение 20 минут. После центрифугирования надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют 4 мл
40 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
45 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 локусов rs505922 ABO, rs8176720 ABO и rs6136 SELP осуществлялся методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на термоциклере CFX-96 Real-Time System («Bio-Rad», США) с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров и зондов (синтезированы в ООО «Тест - Ген» (Ульяновск). 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 - 3 мкл. Генотипирование исследуемых образцов осуществлялось с использованием программного обеспечения «CFX-Manager™» методом дискриминации аллелей по величинам относительных единиц флуоресценции (ОЕФ). Для полиморфного локуса rs505922 ABO зонд с флуоресцентным красителем VIC соответствует аллелю С, зонд с красителем FAM - аллелю Т (фиг. 1), для rs8176720 ABO зонд с флуоресцентным красителем VIC соответствует аллелю С, зонд с красителем FAM - аллелю Т (фиг. 2), для rs6136 SELP зонд с флуоресцентным красителем VIC соответствует аллелю С, зонд с красителем FAM - аллелю А (фиг. 3).

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 полиморфные локусы ABO (rs505922): ■-СС, ●-ТТ, ▲-ТС, ◆-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 полиморфные локусы ABO (rs8176720): ■-СС, ●-ТТ, ▲-СТ, ◆-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 полиморфные локусы SELP (rs6136): ■-СС, ●-АА, ▲-АС, ◆-отрицательный контроль.

Возможность использования предложенного способа для оценки риска развития язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки у женщин на основе молекулярно-генетического тестирования индивидуумов русской национальности подтверждает анализ результатов наблюдений 305 мужчин: 188 больных язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки и 117 здоровых (контрольная группа). Критерием включения в группу больных послужило наличие установленного диагноза ЯБЖ и/или ДПК, в группу контроля вошли индивидуумы, не страдающие язвенной болезнью. Диагноз ставился на основании характерных жалоб, данных анамнеза, клинических проявлений и течения патологии, а также лабораторных и инструментальных методов исследования (Клинические рекомендации. Язвенная болезнь, 2019). Обследование проводилось врачами-гастроэнтерологами ОГБУЗ «Белгородская областная клиническая больница Святителя Иоасафа». Критериями исключения явились нерусская национальность, место рождения вне Центрального Черноземья, возраст до 18 лет, тяжелые хронические заболевания (хроническая почечная, сердечная, дыхательная недостаточность, тяжелая аутоиммунная патология), а также отказ от исследования.

Всем пациентам, находящимся под наблюдением, проведено молекулярно-генетическое исследование полиморфных локусов rs505922 ABO ТС × rs8176720 ABO

СС × rs6136 SELP AC. Изучение SNP×SNP взаимодействий, ассоциированных с развитием язвенной болезни, было проведено с помощью модификации метода снижения размерности MDR (Multifactor Dimensionality Reduction) - Model-Based-MDR (MB-MDR).

В ходе проведенного анализа установлено, что полиморфные локусы rs505922 ABO TC × rs8176720 ABO СС × rs6136 SELP AC повышают риск развития язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки у мужчин ($\beta=1,57$, $p=0,047$).

Применение данного способа позволит прогнозировать риск развития язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки у мужчин русской национальности, при выявлении полиморфных локусов rs505922 ABO TC × rs8176720 ABO СС × rs6136 SELP AC формировать группы риска по развитию язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки и реализовывать в данных группах необходимые лечебно-профилактические мероприятия.

В качестве примеров конкретного применения разработанного способа приведено обследование русских пациентов, уроженцев Центрально-Черноземного региона РФ и не являющихся родственниками между собой: проведено генетическое исследование по полиморфным локусам rs505922 ABO TC × rs8176720 ABO СС × rs6136 SELP AC.

У пациента Б. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров были выявлены полиморфные локусы rs505922 ABO TC × rs8176720 ABO СС × rs6136 SELP AC, что позволило отнести пациента в группу больных с высоким риском развития язвенной болезни. Дальнейшее наблюдение подтвердило диагноз язвенной болезни.

У пациента К. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров были выявлены полиморфные локусы rs505922 ABO TC × rs8176720 ABO TC × rs6136 SELP AC, что позволило отнести пациента в группу индивидумов с низким риском развития язвенной болезни. Дальнейшее наблюдение не подтвердило диагноз язвенной болезни у пациента.

У пациента А. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров были выявлены полиморфные локусы rs505922 ABO TC × rs8176720 ABO TT × rs6136 SELP AC, что позволило отнести пациента в группу индивидумов с низким риском развития язвенной болезни. Дальнейшее наблюдение не подтвердило диагноз язвенной болезни у пациентки.

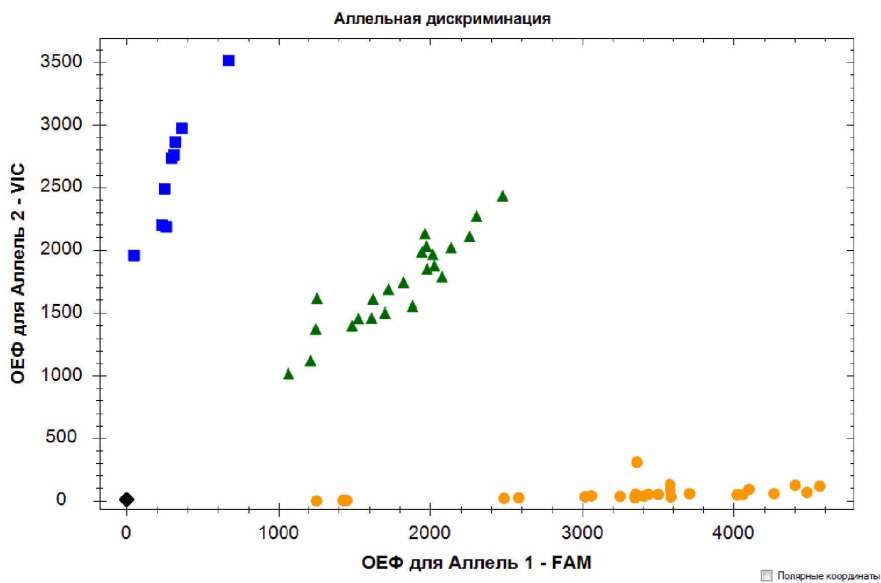
У пациента Х. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров были выявлены полиморфные локусы rs505922 ABO TC × rs8176720 ABO TT × rs6136 SELP AA, что позволило отнести пациента в группу индивидумов с низким риском развития язвенной болезни. При дальнейшем наблюдении диагноз язвенной болезни у пациента не подтвердился.

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

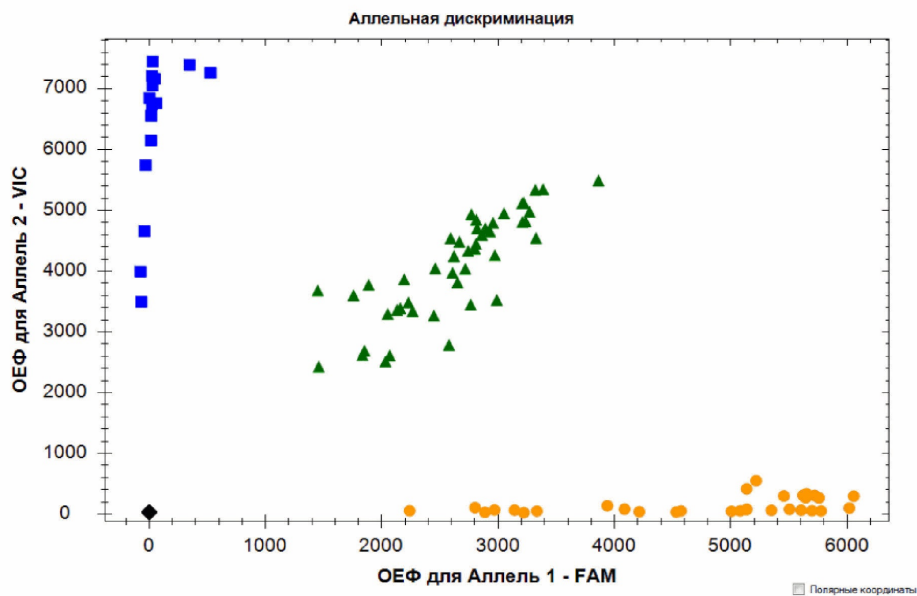
(57) Формула изобретения

Способ прогнозирования риска развития язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки у мужчин русской национальности на основе молекулярно-генетического тестирования, включающий выделение ДНК из лейкоцитов периферической венозной крови и анализ полиморфных локусов rs505922 ABO, rs8176720 ABO и rs6136 SELP, высокий риск развития язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки прогнозируют при выявлении комбинации полиморфных локусов rs505922 ABO TC × rs8176720 ABO СС × rs6136 SELP AC.

1

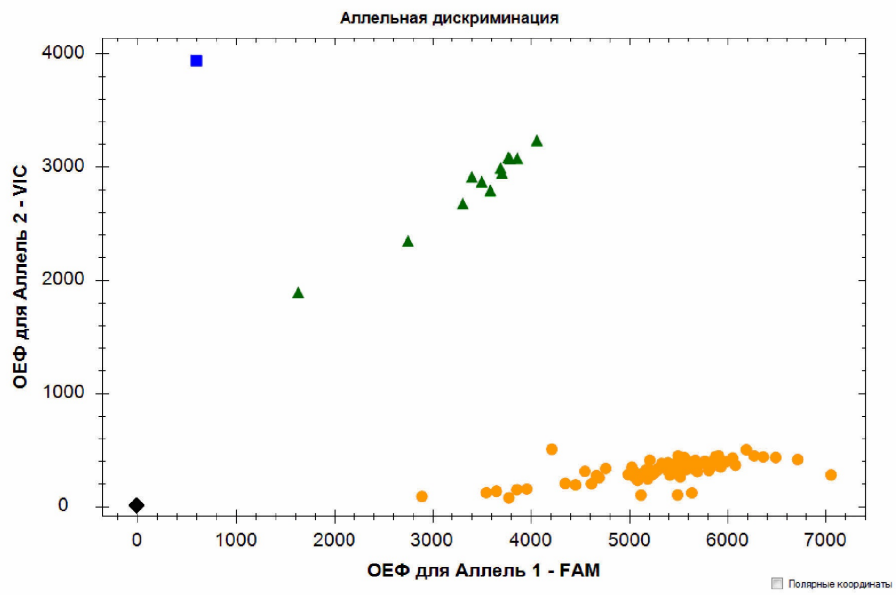


Фиг. 1



Фиг. 2

2



Фиг. 3