



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 33/50 (2024.01)

(21)(22) Заявка: 2023127001, 20.10.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
20.10.2023

Дата регистрации:
01.04.2024

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 20.10.2023

(45) Опубликовано: 01.04.2024 Бюл. № 10

Адрес для переписки:

308015, г. Белгород, ул. Победы, 85, НИУ
"БелГУ", Крылова Анна Сергеевна

(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. "Ассоциации полиморфных
вариантов генов-кандидатов с развитием
H.pylori-негативной язвенной болезни
двенадцатиперстной кишки у жителей
Центрального Черноземья России"; Научные
результаты биомедицинских исследований,
2023, N 9(3), с.333-346. YOSHIAKI USUI et al.
"Impact of PSCA polymorphisms on the risk of
(см. прод.)

(54) Способ прогнозирования риска развития язвенной болезни двенадцатиперстной кишки на основе молекулярно-генетического тестирования

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и медицине. Предложен способ прогнозирования риска развития язвенной болезни двенадцатиперстной кишки на основе молекулярно-генетического тестирования, включающий забор периферической венозной крови, выделение ДНК из лейкоцитов периферической венозной крови и анализ полиморфных локусов rs2294008 гена PSCA и rs2519093 гена ABO. Выявление при анализе комбинации полиморфных локусов rs2294008 (PSCA) CC x rs2519093 (ABO) CC прогнозирует

высокий риск развития язвенной болезни двенадцатиперстной кишки у индивидуумов русской национальности, родившихся в Центральном Черноземье России и проживающих в Белгородской области. Изобретение обеспечивает возможность формировать группы риска по развитию язвенной болезни двенадцатиперстной кишки у индивидуумов русской национальности на доклиническом уровне и реализовывать в данных группах необходимые лечебно-профилактические мероприятия. 2 ил.

RU 2 816 519 C1

RU 2 816 519 C1

(56) (продолжение):

duodenal ulcer"; Journal of epidemiology, 2021, N 31(1), p.12-20. РАШИНА О.В., ЧУРНОСОВ М.И. "Вклад межгенных взаимодействий полиморфных вариантов генов-кандидатов в развитие язвенной болезни желудка"; Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология", 2022, N 207(11), с.102-107. RU 2657786 C1, 15.06.2018.

R U 2 8 1 6 5 1 9 C 1

R U 2 8 1 6 5 1 9 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11)

2 816 519 (13) **C1**

(51) Int. Cl.
G01N 33/50 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
G01N 33/50 (2024.01)

(21)(22) Application: **2023127001, 20.10.2023**

(24) Effective date for property rights:
20.10.2023

Registration date:
01.04.2024

Priority:

(22) Date of filing: **20.10.2023**

(45) Date of publication: **01.04.2024** Bull. № 10

Mail address:

**308015, g. Belgorod, ul. Pobedy, 85, NIU "BelGU",
Krylova Anna Sergeevna**

(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 DUODENAL ULCER BASED ON MOLECULAR GENETIC TESTING**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology; medicine.

SUBSTANCE: disclosed is a method for predicting the risk of developing duodenal ulcer based on molecular genetic testing, involving sampling peripheral venous blood, recovering DNA from peripheral venous blood leukocytes and analysing polymorphic loci rs2294008 of gene PSCA and rs2519093 of gene ABO. Detection during analysis of combination of polymorphic loci rs2294008 (PSCA) CC x rs2519093 (ABO) CC predicts a high risk of developing duodenal

ulcer in individuals of Russian nationality born in the Central Black Earth Region of Russia and living in the Belgorod region.

EFFECT: invention enables to form risk groups for developing duodenal ulcer in individuals of Russian nationality at the preclinical level and to implement the necessary therapeutic and preventive measures in these groups.

1 cl, 2 dwg

RU 2 816 519 C1

RU 2 816 519 C1

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

Язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки (ЯБ ДПК) – хроническое рецидивирующее заболевание, характерным признаком которого в период обострения является образование язв слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки (Моисеев В.С. и др., 2018). В России, по данным Федеральной службы государственной статистики (Здравоохранение в России, 2019 г.), количество зарегистрированных случаев ЯБ в 2018 году составляет 850,1 на 100000 человек, в том числе впервые выявленных – 71,9, среди которых около 60% пациентов – лица трудоспособного возраста (Колотилова М.Л. и др., 2014). ЯБ ДПК встречается в 4 раза чаще, чем язвенная болезнь желудка (Ивашкин В.Т. и др., 2016, 2020) и поражает лиц в возрасте от 30 до 55 лет (McQuaid K. R., 2020).

Осложнения встречаются у 10-20% больных ЯБ (Tarasconi A. et al., 2020). В связи с тяжестью клинической картины и высокой частотой наибольшую опасность представляют перфорации и кровотечения. Хотя кровотечения встречаются в 6 раз чаще, чем перфорации, именно последние являются наиболее частыми показаниями к экстренному оперативному вмешательству и примерно в 40% случаев они становятся причиной летальности при ЯБ (Tarasconi A. et al., 2020; Joo M.K. et al., 2020).

Полиморфный локус rs2294008 гена PSCA, по результатам полногеномного исследования, выполненного в японской популяции, играет роль в развитии ЯБ ДПК (аллель С, OR=1,84, $p=3,92 \times 10^{-33}$) (Tanikawa C. et al., 2012). Эти данные подтверждают репликативные исследования, проведенными по этому локусу среди населения Японии для язвенной болезни желудка (аллель С, OR=1,13, $p=5,85 \times 10^{-7}$) (Tanikawa C. et al., 2013) и язвенной болезни двенадцатиперстной кишки (аллель С, OR=1,34; $p=2,28 \times 10^{-6}$) (Usui Y. et al., 2019), а также среди жителей Испании для язвенной болезни двенадцатиперстной кишки (аллель Т, OR=0,52, $p=0,005$) (García-González M.A. et al., 2015).

Ген PSCA (антиген стволовых клеток простаты) экспрессируется в предстательной железе, мочевом пузыре, в некоторых других органах, а также в дифференцирующихся эпителиальных клетках желудка, кодирует гликозилфосфатидилинозитол — мембранный гликопротеин, играющий роль в пролиферации и обновлении клеток (<https://www.omim.org>, <https://www.genecards.org>, Tanikawa C. et al., 2012, 2013). За счет этого, в зависимости от уровня экспрессии, ген PSCA может участвовать в разнонаправленных процессах, происходящих в слизистой оболочке ДПК: язвообразовании и малигнизации (Lu Y. et al., 2010; Zeng Z. et al., 2011; Tanikawa C. et al., 2012, 2013; Shi D. et al., 2012; Zhang Q.H. et al., 2012; Zhang T. et al., 2012; Matsuda K. et al., 2013; Saeki N. et al., 2013; Gao J. et al., 2015; Garcia-Gonzalez M.A. et al., 2015; Geng P. et al., 2015; Gu Y. et al., 2015; Mocellin S. et al., 2015; Wang M. et al., 2015; Chandra V. et al., 2016; Qiu L.-X. et al., 2016; Qin Z. et al., 2017; Usui Y. et al., 2019; Yan K. et al., 2019). Необходимо также отметить, что ген PSCA может выступать в качестве модулятора никотиновых ацетилхолиновых рецепторов и, следовательно, данный ген может влиять на вегетативную нервную систему и за счет этого также участвовать в развитии ЯБ (<https://www.genecards.org>).

Данные ученых из Финляндии (включая мета-анализ предыдущего полногеномного исследования, обследовано в общей сложности 13577 индивидуумов) свидетельствуют о связи полиморфного локуса rs2519093 с уровнем sE-селектина и sICAM-1 ($P=4,48 \times 10^{-305}$ и $P=7,43 \times 10^{-48}$ соответственно). Исследование по составлению геномного атласа протеома плазмы человека провели Sun B.B. et al. (2018), где показали наличие связи

rs2519093 гена ABO с уровнем Р-селектина ($p=4 \times 10^{-48}$) и Е-селектина ($p=2 \times 10^{-474}$).

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

В изученной научно-медицинской и доступной патентной литературе авторами не было обнаружено способа прогнозирования риска развития язвенной болезни двенадцатиперстной кишки у индивидуумов русской национальности, родившихся в Центральном Черноземье России и проживающих в Белгородской области, на основе данных о комбинации полиморфных локусов rs2294008 (PSCA) CC × rs2519093 (ABO) CC.

Известен способ прогнозирования риска развития и прогрессирования язвенной болезни по патенту РФ № 2231794 (опубликован 27.06.2004), включающий исследования желудочных проб, основанный на измерении скорости диффузии ионов водорода через слой слизи, покрывающей слизистую оболочку желудка, путем введения в желудок тестового 0,1 Н 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 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 полиморфных локусов.

Патент РФ № 2318217 (опубликован 27.02.2008), в котором описан способ и устройство для прогнозирования риска развития язвенной болезни. Сущность способа заключается 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 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 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. Напряжение между электродами равно диффузионному потенциалу. Использование способа позволяет своевременно начать профилактическое лечение язвенной болезни двенадцатиперстной кишки. Недостатком этого способа является его трудоемкость, он не учитывает роль генетических полиморфных локусов.

Патент РФ № 2281037 (опубликован 10.08.2006), в котором описан способ прогнозирования развития язвенной болезни 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:

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

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

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 A и B выбирают из таблицы «Коэффициенты дискриминантных функций» и при $P1 > P2$ прогнозируют риск развития язвенной болезни двенадцатиперстной кишки. Недостатком этого способа является то, что он не учитывает роль генетических полиморфных локусов.

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 *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 трудоемкость подсчета и применим только для коренных жителей Республики Хакасия.

Технической задачей заявленного способа является расширение арсенала способов диагностики, а именно создание способа прогнозирования риска развития язвенной болезни на основе данных о комбинации полиморфных локусов $rs2294008$ (PSCA) CC × $rs2519093$ (ABO) CC.

Технический результат использования изобретения – получение критериев оценки риска развития язвенной болезни двенадцатиперстной кишки у индивидуумов русской национальности, родившихся в Центральном Черноземье России и проживающих в Белгородской области, на основе данных о комбинации полиморфных локусов $rs2294008$ (PSCA) CC × $rs2519093$ (ABO) CC, включающий:

- забор периферической венозной крови;
- выделение ДНК из лейкоцитов периферической венозной крови;
- анализ полиморфных локусов $rs2294008$ PSCA и $rs2519093$ ABO;
- прогнозирование высокого риска развития язвенной болезни двенадцатиперстной кишки на основе данных о комбинации полиморфных локусов $rs2294008$ (PSCA) CC × $rs2519093$ (ABO) CC.

Новизна и изобретательский уровень заключаются в том, что из уровня техники не известна возможность прогнозирования развития язвенной болезни двенадцатиперстной кишки с учетом молекулярно-генетического тестирования у индивидуумов русской национальности на основе данных о комбинации полиморфных локусов $rs2294008$ (PSCA) CC × $rs2519093$ (ABO) CC.

Выделение геномной ДНК из периферической крови осуществляют методом

фенольно-хлороформной экстракции (Mathew, 1984) в два этапа. На первом этапе к 4 мл крови с ЭДТА добавляют 25 мл лизирующего буфера, содержащего 320мМ сахарозы, 1% тритон X-100, 5мМ MgCl₂, 10мМ трис-HCl (pH=7,6). Полученную смесь перемешивают и центрифугируют при 4°C, 4000 об./мин. в течение 20 минут. После центрифугирования надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют 4 мл раствора, содержащего 25 мМ ЭДТА (pH=8,0) и 75 мМ NaCl, ресуспензируют. Затем прибавляют 0,4 мл 10% SDS, 35 мкл протеиназы К (10мг/мл) и инкубируют образец при 37°C в течение 16 часов.

На втором этапе из полученного лизата последовательно проводят экстракцию ДНК равными объемами фенола, фенол-хлороформа (1:1) и хлороформа с центрифугированием при 4000 об/мин. в течение 10 минут. После каждого центрифугирования производят отбор водной фазы. ДНК осаждают из раствора двумя объемами охлажденного 96% этанола. После лиофилизации полученную ДНК растворяют в бидистиллированной, деионизованной воде и хранят при температуре -20°C. Выделенную ДНК используют для проведения полимеразной цепной реакции синтеза ДНК.

Анализ полиморфных локусов rs2294008 гена PSCA и rs2519093 гена ABO 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, деионизованная вода – 3мкл. Генотипирование исследуемых образцов осуществлялось с использованием программного обеспечения «CFX-Manager™» методом дискриминации аллелей по величинам относительных единиц флуоресценции (ОЕФ). Для полиморфного локуса rs2294008 гена PSCA зонд с флуоресцентным красителем VIC соответствует аллелю С, зонд с красителем FAM – аллелю Т (фиг. 1), для rs6136 гена SELP зонд с флуоресцентным красителем VIC соответствует аллелю G, зонд с красителем FAM – аллелю А (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 полиморфного локуса PSCA (rs2294008): ■-CC, ●-TT, ▲-CT, ◆-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 полиморфного локуса ABO (rs2519093): ■-CC, ●-TT, ▲-CT, ◆-отрицательный контроль.

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).

Возможность использования предложенного способа для оценки прогнозирования риска развития язвенной болезни у индивидуумов подтверждает анализ результатов наблюдений 529 пациентов (182 - больные язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки, 347 – группа контроля). В выборки для исследования включались индивидуумы русской национальности, родившиеся в Центральном Черноземье России и проживающие в Белгородской области (Чурносоев М.И., Сорокина И.Н., Балановская Е.В. Генофонд населения Белгородской области. Динамика индекса эндогамии в

районных популяциях // Генетика. 2008. Т. 44. № 8. С. 1117-1125), не имеющие родства между собой, подписавшие информированное согласие на включение их в исследование. В группу больных включались пациенты с установленным диагнозом «язвенная болезнь», который устанавливался на основании анамнестических данных (характерные 5 жалобы, анамнез заболевания), физикального обследования (обнаружение болезненности и резистентности мышц брюшной стенки при пальпации), инструментального обследования (обнаружение язвенного дефекта при эндоскопическом исследовании двенадцатиперстной кишки). (Клинические рекомендации, 2019).
 10 Обследование больных язвенной болезнью проводилось на базе гастроэнтерологического отделения Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа.

Контрольная группа формировалась при профилактических осмотрах (обследованиях) населения, и в нее входили пациенты, не имеющие клинических и эндоскопических признаков язвенной болезни.

15 Все исследования проводились под контролем этического комитета ОГБУЗ БОКБ Святителя Иоасафа (протокол № 15 от 21.12.2016) с информированного согласия пациентов на использование материалов лечебно-диагностических мероприятий, связанных с заболеванием, для научно-исследовательских целей и протоколировались по стандартам этического комитета Российской Федерации.

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

Установлена связь комбинации полиморфных локусов rs2294008 (PSCA) CC × rs2519093 (ABO) CC с повышенным риском развития язвенной болезни ($\beta=0,73$, $p=0,001$).

25 Применение данного способа позволит прогнозировать риск развития язвенной болезни двенадцатиперстной кишки у индивидуумов русской национальности, при выявлении комбинации полиморфных локусов rs2294008 (PSCA) CC × rs2519093 (ABO) CC формировать группы риска по развитию язвенной болезни двенадцатиперстной кишки и реализовывать в данных группах необходимые лечебно-профилактические 30 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 rs2294008 PSCA и rs2519093 ABO.

35 У пациента Б. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров были выявлены полиморфные локусы CC rs2294008 (PSCA) и CC rs2519093 (ABO), что позволило отнести пациента в группу индивидуумов с высоким риском развития ЯБ ДПК. Дальнейшее наблюдение подтвердило диагноз язвенной болезни ДПК у пациента.

40 У пациента Н. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров были выявлены полиморфные локусы TT rs2294008 (PSCA) и CT rs2519093 (ABO), что позволило отнести пациента в группу индивидуумов с низким риском развития ЯБ ДПК. Дальнейшее наблюдение не подтвердило диагноз язвенной болезни ДПК у пациента.

45 У пациентки М. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров были выявлены полиморфные локусы TT rs2294008 (PSCA) и TT rs2519093 (ABO), что позволило отнести пациентку в группу индивидуумов с низким риском развития ЯБ ДПК. Дальнейшее наблюдение не подтвердило диагноз язвенной болезни у пациентки.

У пациентки Ю. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров

были выявлены полиморфные локусы СТ rs2294008 (PSCA) и СТ rs2519093 (ABO), что позволило отнести пациентку в группу индивидуумов с низким риском развития ЯБ ДПК. При дальнейшем наблюдении диагноз язвенной болезни у пациентки не подтвердился.

- 5 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.

(57) Формула изобретения

- 10 Способ прогнозирования риска развития язвенной болезни двенадцатиперстной кишки на основе молекулярно-генетического тестирования, включающий забор периферической венозной крови, выделение ДНК из лейкоцитов периферической венозной крови, отличающийся тем, что выявление при анализе комбинации полиморфных локусов rs2294008 (PSCA) СС х rs2519093 (ABO) СС прогнозирует высокий
15 риск развития язвенной болезни двенадцатиперстной кишки у индивидуумов русской национальности, родившихся в Центральном Черноземье России и проживающих в Белгородской области.

20

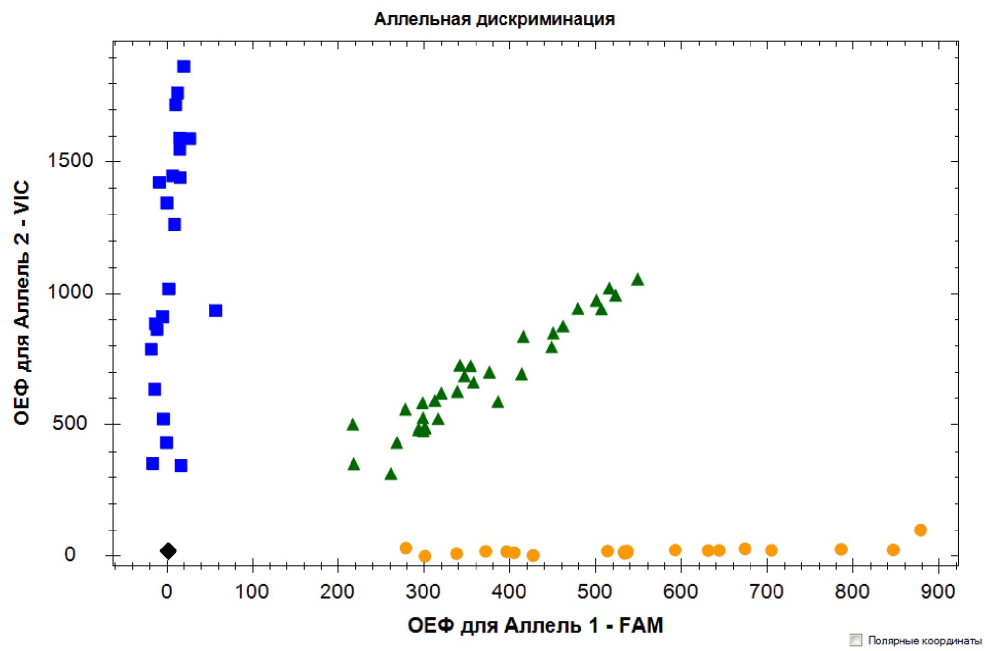
25

30

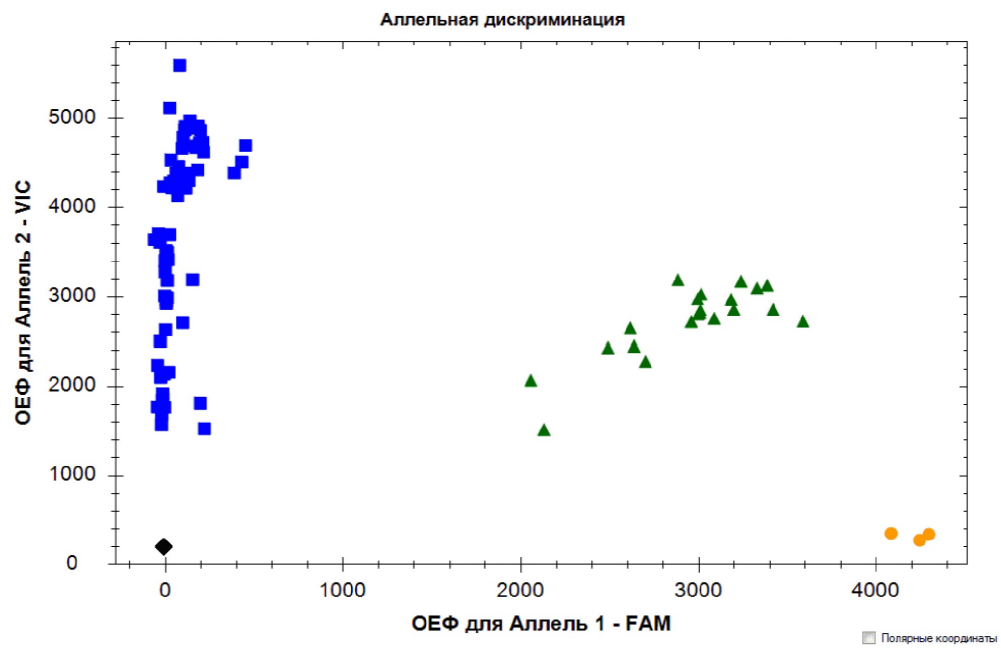
35

40

45



Фиг. 1



Фиг. 2