



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2015118903/15, 20.05.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
20.05.2015

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 20.05.2015

(45) Опубликовано: 27.09.2016 Бюл. № 27

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2406089 C1, 10.12.2010. С.С. Демин и др. / Современные представления об этиопатогенезе хронического калькулезного холецистита и роль молекулярно-генетических факторов в его формировании / Научные ведомости, Серия Медицина. Фармация / 2011, 10 (105), выпуск 14, стр. 30-36. RU 2123699 C1, 20.12.1998.

Адрес для переписки:

308015, обл. Белгородская, г. Белгород, ул.  
Победы, 85, ОИС НИУ "БелГУ", Токтарева Т.М.

(72) Автор(ы):

Чурносов Михаил Иванович (RU),  
Черкашина Ольга Владимировна (RU),  
Демин Сергей Сергеевич (RU),  
Полоников Алексей Валерьевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего  
образования "Белгородский государственный  
национальный исследовательский  
университет" (НИУ "БелГУ") (RU)

## (54) СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РИСКА РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКОГО КАЛЬКУЛЕЗНОГО ХОЛЕЦИСТИТА У МУЖЧИН

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицинской диагностики и представляет собой способ прогнозирования риска развития хронического калькулезного холецистита (ХКХ) у мужчин русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья России, включающий забор крови, отличающийся тем, что после выделения ДНК из периферической венозной крови методом фенольно-хлороформной экстракции проводят анализ полиморфизмов генов интерлейкинов IL-1A -889T>C, IL-1B -511C>T, IL-4 -584C>T, IL-5 -703C>T и прогнозируют повышенный риск

развития ХКХ в случае выявления генетических вариантов -511T IL-1B, -511TT IL-1B, либо комбинации аллелей -889T IL-1A, -511T IL-1B и -703C IL-5, либо комбинации аллелей -511T IL-1B и -703C IL-5, либо комбинации аллелей -889T IL-1A, -511T IL-1B и -584T IL-4, либо комбинации аллелей -889T IL-1A и -511T IL-1B, прогнозируют низкий риск развития данного заболевания у мужчин в случае выявления генетического варианта -511CC IL-1B. Изобретение обеспечивает расширение арсенала способов прогнозирования риска развития ХКХ у пациентов мужского пола. 6 ил., 7 пр.

RU 2 598 749 C 1

RU 2 598 749 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*G01N 33/48* (2006.01)  
*G01N 33/50* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2015118903/15, 20.05.2015**

(24) Effective date for property rights:  
**20.05.2015**

Priority:

(22) Date of filing: **20.05.2015**

(45) Date of publication: **27.09.2016** Bull. № 27

Mail address:

**308015, obl. Belgorodskaya, g. Belgorod, ul. Pobedy,  
85, OIS NIU "BelGU", Toktareva T.M.**

(72) Inventor(s):

**Churnosov Mikhail Ivanovich (RU),  
Cherkashina Olga Vladimirovna (RU),  
Demin Sergej Sergeevich (RU),  
Polonikov Aleksej Valerevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe  
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego  
obrazovaniya "Belgorodskij gosudarstvennyj  
natsionalnyj issledovatel'skij universitet" (NIU  
"BelGU") (RU)**

(54) **METHOD FOR PREDICTION OF RISK OF DEVELOPMENT OF CHRONIC CALCULOUS CHOLECYSTITIS IN MALES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medical diagnostics, and represents a method for prediction of risk of chronic calculous cholecystitis (CCC) in males of Russian ethnicity, which are natives of Central black earth region of Russia, including blood sampling, differing by the fact that after DNA is recovered from peripheral venous blood by carbolic-chloroform extraction of interleukin gene polymorphisms are analysed IL-1A -889T>C, IL-1B -511C>T, IL-4 -584C>T, IL-5 -703C>T and high risk of developing CCC is predicted in case of detection of genetic variants

-511T IL-1B, -511TT IL-1B, or a combination of alleles -889T IL-1A, -511T IL-1B and -703C IL-5, or a combination of alleles -511T IL-1B and -703C IL-5, or a combination of alleles -889T IL-1A, -511T IL-1B and -584T IL-4, or a combination of alleles -889T IL-1A and -511T IL-1B, predicting low risk of given disease in males in case of detection of genetic variant -511CC IL-1B.

EFFECT: invention provides extended range of methods for prediction of risk of developing CCC in male patients.

1 cl, 6 dwg, 7 ex

**RU 2 598 749 C 1**

**RU 2 598 749 C 1**

Изобретение относится к области медицинской диагностики, может быть использовано для прогнозирования риска развития хронического калькулезного холецистита (далее ХКХ) у мужчин.

Хронический калькулезный холецистит - обменно-воспалительное заболевание билиарной системы, характеризующееся образованием конкрементов в просвете желчного пузыря [Ильченко А.А. Болезни желчного пузыря и желчных путей: руководство для врачей / А.А. Ильченко. - 2-е изд. - Москва: Мед. информ. агентство, 2011. - 877 с.]. Среди болезней органов пищеварения ХКХ встречается достаточно часто и составляет почти 90% всех случаев желчнокаменной болезни (далее ЖКБ), заболеваемость которой в мире достигает 10%. По данным статистических исследований последних лет, ЖКБ страдают почти каждая пятая женщина и каждый десятый мужчина [Коханенко Н. Желчнокаменная болезнь / Н. Коханенко, А. Глебова // Медицинская газета. - 2011. - 2 марта. - С. 8-9].

За всю историю изучения ЖКБ существовало несколько теорий патогенеза заболевания. Основными механизмами образования желчных камней считают обменный и воспалительный [Полунина Т.Е. Желчнокаменная болезнь / Т. Е. Полунина // Лечащий врач. - 2005. - №2. - С. 34-38]. Среди генов-кандидатов, регулирующих преимущественно процессы воспаления, важное значение имеют интерлейкины. Интерлейкины, взаимодействуя со специфическими рецепторами, являются одними из главных звеньев в воспалительном каскаде при ЖКБ, изменяя интенсивность и длительность воспалительных, склеротических и литогенных процессов в желчном пузыре [Царегородцева Т.М. Цитокины при заболеваниях органов пищеварения [Электронный ресурс] / Т.М. Царегородцева // Регистр лекарственных средств России: энцикл. лекарств и товаров аптечного ассортимента: офиц. сайт / группа компаний РЛС. - Москва, 2009. - 28 апр. - Режим доступа: [http://www.rlsnet.ru/articles\\_426.htm](http://www.rlsnet.ru/articles_426.htm).].

IL-1A - белок, кодируемый геном IL-1A, который располагается на второй хромосоме (2q14). IL-1A - провоспалительный цитокин, обладающий широким спектром метаболической, физиологической, кроветворной деятельности, а также играет одну из центральных ролей в регуляции иммунного ответа. После попадания инфекции в организм, IL-1A активизирует множество процессов системы иммунного ответа. В частности: стимулирует распространение фибробластов, индуцирует синтез протеаз и белков острой фазы, влияет на увеличение числа нейтрофилов крови, активизирует распространение лимфоцитов и вызывает лихорадку [Dinarello C.A. Induction of interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist / C.A. Dinarello // Semin. Oncol. - 1997. - №24, №3, suppl. 9. - P. S981-S993].

Ген IL-1A содержит 7 экзонов и 6 интронов, на 3 и 5 концах он имеет нетранслируемые области. Кроме того, он обладает высокой степенью гомологии интронных последовательностей, что, возможно, регулирует экспрессию этого гена. [Громова А.Ю. Полиморфизм генов семейства IL-1 человека / А.Ю. Громова, А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. - 2005. - Т. 4, №2. - С. 3-12].

IL-1B - белок, кодируемый геном IL-1B, который располагается на второй хромосоме (2q13-q21). IL-1B является многофункциональным цитокином с широким спектром действия. При действии патогенных факторов он играет важную роль в формировании и поддержании защитной реакции организма. Продуцируется IL-1B, в основном, макрофагами и моноцитами [Schönbeck U. Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing / U. Schönbeck, F. Mach, P. Libby // J. Immunol. - 1998. - Vol. 161, №7. - P. 3340-3346].

IL-1B участвует в инициации и регуляции воспалительных, иммунных процессов,

активации нейтрофилов, Т- и В-лимфоцитов, стимуляции синтеза белков острой фазы. За счет IL-1 В происходит повышение хемотаксиса, фагоцитоза, гемопоэза, проницаемости сосудистой стенки, цитотоксической и бактерицидной активности. Отмечается повышение уровня данного цитокина в крови у пациентов с язвенной болезнью желудка, панкреатитом и желчнокаменной болезнью до 1100-3200 пг/мл, по сравнению с контрольной группой (до 40 пг/мл) [Царегородцева Т.М. Цитокины при заболеваниях органов пищеварения / Т.М. Царегородцева // Регистр лекарственных средств России: энцикл. лекарств и товаров аптечного ассортимента: офиц. сайт / группа компаний РЛС. - Москва, 2009. - 28 апр. - Режим доступа: [http://www.rlsnet.ru/articles\\_426.htm](http://www.rlsnet.ru/articles_426.htm)].

IL-4 - лимфокин, массой 15-20 kDa. Ген IL-4 располагается на пятой хромосоме. Основными продуцентами IL-4 являются Т-клетки (Th2). Данный цитокин принимает участие в дифференцировке Т- и В-лимфоцитов. Наиболее мощный эффект интерлейкина-4 связывают с регуляцией синтеза других цитокинов. Он принимает участие в многочисленных биологических процессах, таких как воспалительные реакции и иммунный ответ [Характер распределения аллелей генов ARIL-1 и IL-4 у больных ревматоидным артритом русской национальности, проживающих в Челябинской области / Д.С. Сташкевич, А.Л. Бурмистрова, Т.А. Сулова [и др.] // Успехи современного естествознания. - 2006. - №3. - С. 52-53].

Повышение уровня IL-4 отмечается и при регенераторно-восстановительных процессах хронических рецидивирующих заболеваний органов пищеварения, таких как: язвенная болезнь желудка, панкреатит, желчнокаменная болезнь. [Царегородцева Т.М. Цитокины при заболеваниях органов пищеварения / Т.М. Царегородцева // Регистр лекарственных средств России: энцикл. лекарств и товаров аптечного ассортимента: офиц. сайт / группа компаний РЛС. - Москва, 2009. - 28 апр. - Режим доступа: [http://www.rlsnet.ru/articles\\_426.htm](http://www.rlsnet.ru/articles_426.htm)].

IL-5 - димерный белок, массой 50-60 kDa. Ген IL-5 располагается на пятой хромосоме 5q23 -q31. Продуцируется IL-5 Т-клетками (Th 2). В пептидной части одной цепи IL-5 содержатся 115 аминокислотных остатков. Сходной функциональной активностью обладают его мономерная и димерная формы. IL-5 инициирует продукцию иммуноглобулинов и стимулирует синтез IgA. [Murphy J.M. IL-3, IL-5, and GM-CSF signaling: crystal structure of the human beta-common receptor / J.M. Murphy, I.G. Young // Vitam. Horm. - 2006. - Vol. 74. - P. 1-30].

Помимо клеток иммунной системы, данный цитокин оказывает влияние и на миелоидные клетки. IL-5 оказывает избирательное действие на костномозговых предшественников эозинофилов, регулируя их пролиферацию и дифференцировку. Наряду с этим, IL-5 увеличивает продукцию супероксидантов и усиливает хемотаксис данных типов клеток [База знаний по биологии человека / Разраб. А.А. Александров. - Москва, 1990-2011. - Режим доступа: <http://humbio.ru>].

Для оценки сложившейся патентной ситуации был выполнен поиск по охраняемым документам за период с 1990 по 2014 гг. Анализ документов производился по направлению: способ прогнозирования риска развития хронического калькулезного холецистита у мужчин на основе молекулярно-генетических данных в зависимости от полиморфных маркеров генов интерлейкинов.

Источники информации: сайты Федерального института промышленной собственности <http://fips.ru>.

Известен способ прогнозирования характера течения хронического калькулезного холецистита по патенту РФ №2406089 (заявка №2009124685, 29.06.2009), где предложен

способ прогнозирования характера течения хронического калькулезного холецистита путем выделения ДНК из периферической венозной крови больных и выявления полиморфизма гена TNF. При выявлении генотипов -308GA и -308AA прогнозируют тяжелое течение хронического калькулезного холецистита с частыми обострениями, перемежающегося характера. При выявлении генотипа -308GG прогнозируют среднетяжелое и легкое течение хронического калькулезного холецистита, носящего рецидивирующий или монотонный характер. Его недостатком является то, что его невозможно использовать для прогнозирования риска развития хронического калькулезного холецистита у мужчин.

Известен способ прогнозирования хронического холецистита по патенту РФ №2014614, опублик. 15.06.1994, согласно которому в пробе крови определяют группу крови АВО, тип Нр и НІА-антигены. При наличии в фенотипе маркеров, из числа характерных для хронического холецистита (В (III), Нр 1 - 1, НІА А3, А28, А30, В5, В13, В35, В40), суммируют их общие прогностические коэффициенты и при значении суммы 13 и более прогнозируют риск развития хронического холецистита. Для уточнения клинической формы холецистита выявляют в фенотипе наличие дифференциальных генетических маркеров форм заболевания (О(1), Нр 1 - 1, НІА В5, В7, В18, В35), суммируют их дифференциальные прогностические коэффициенты и при сумме, равной 6 и более, прогнозируют риск развития бескаменного холецистита, а при сумме, равной -6 и менее, - риск развития каменного холецистита.

Его недостатком является то, что не используются данные о генетических полиморфизмах интерлейкинов и их сочетаний для прогнозирования риска развития хронического калькулезного холецистита у мужчин.

Таким образом, в изученной научно-медицинской и доступной патентной литературе авторами не было обнаружено способа прогнозирования риска развития хронического калькулезного холецистита у мужчин на основе данных о генетических полиморфизмах интерлейкинов и их сочетаний IL-1A -889T>C, IL-1 B -511C>T, IL-4 -584C>T, IL-5 -703C>T.

Задачей настоящего изобретения является расширение арсенала способов прогнозирования риска развития хронического калькулезного холецистита у пациентов мужского пола русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья России, с учетом полиморфизмов генов интерлейкинов.

Технический результат использования изобретения - получение критериев оценки риска развития ХКХ у индивидуумов мужского пола русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья России, в зависимости от наличия генетических вариантов полиморфных маркеров IL-1A -889T>C, IL-1 B -511C>T, IL-4 -584C>T, IL-5 -703C>T и их сочетаний.

В соответствии с поставленной задачей был разработан способ прогнозирования риска развития ХКХ у мужчин по наличию генетических вариантов полиморфных маркеров IL-1A -889T>C, IL-1 B -511C>T, IL-4 -584C>T, IL-5 -703C>T и их сочетаний, включающий:

- выделение ДНК из периферической венозной крови методом фенольно-хлороформной экстракции;
- генотипирование образцов ДНК с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров;
- прогнозирование повышенного риска развития ХКХ среди индивидуумов мужского пола русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья России, в случае выявления генетических вариантов -511T IL-1 B, -511TT IL-1 B, либо

комбинации аллелей -889Т IL-1А, -511Т IL-1В и -703С IL-5, либо комбинации аллелей -511Т IL-1 В и -703С IL-5, либо комбинации аллелей -889Т IL-1А, -511Т IL-1 В и -584Т IL-4, либо комбинации аллелей -889Т IL-1А и -511Т IL-1В;

5 - прогнозирование пониженного риска развития ХКХ среди индивидуумов мужского пола русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья России, в случае выявления генотипа 511СС IL-1 В.

Новизна и изобретательский уровень заключаются в том, что из уровня техники не известна возможность прогнозирования риска развития ХКХ у мужчин по наличию генетических вариантов полиморфных маркеров IL-1А -889Т>С, IL-1 В -511С>Т, IL-4 -584С>Т, IL-5 -703С>Т и их сочетаний.

Изобретение охарактеризовано на фигурах 1-6:

на фиг. 1 представлена дискриминация аллелей по локусу IL-1А -889 Т>С (rs 1800587), где 2, 3, 4 - -889ТТ IL-1А; 5, 6, 10 - -889СС IL-1А; 1, 7-9, 11-14 - -889СТ IL-1А;

на фиг. 2 представлена дискриминация аллелей по локусу IL-1 В -511С>Т (rs419598),  
15 где 1, 9 - гомозиготы -511ТТ; 2, 3, 5, 7, 8, 12 - гетерозиготы -511СТ; 4, 6, 10-11 - гомозиготы -511СС;

на фиг. 3 представлена дискриминация аллелей по локусу IL-4 -584С>Т (rs 2243250), где ● - -584СС IL-4, ■ - -584ТТ IL-4, ▲ - -584СТ IL-4, ◆ - отрицательный контроль;

на фиг. 4 представлена дискриминация аллелей по локусу IL-5 -703С>Т (rs12704795),  
20 где 1, 3-8, 12, 15 - гомозиготы -703СС; 10, 11, 13, 14 - гетерозиготы -703СТ; 2, 9 - гомозиготы -703ТТ;

на фиг. 5 в таблице представлены частоты комбинаций генетических вариантов интерлейкинов у больных хроническим калькулезным холециститом и в контрольной группе мужского пола;

25 на фиг. 6 показана роль генов интерлейкинов в развитии хронического калькулезного холецистита у мужчин.

На фигуре 3 две полосы, вертикальная и горизонтальная, делят график на четыре секции: одна для каждого гомозиготного состояния, одна для гетерозиготного состояния и секция без реакции. Присвоение генотипов неизвестным образцам определяется  
30 вычерчиванием уровня относительной флуоресценции (далее УОФ) для одного флуорофора на оси х, относительно УОФ для другого флуорофора на оси у на диаграмме дискриминации аллелей. Зонд с флуоресцентным красителем ROX соответствует аллелю Т, зонд с красителем FAM -аллелю С.

• Если значения УОФ неизвестного образца находятся выше горизонтальной полосы  
35 и правее вертикальной полосы, генотип гетерозиготен (СТ).

• Если значения УОФ неизвестного образца находятся выше горизонтальной полосы и левее вертикальной полосы, генотип гомозиготен по аллелю Т (УОФ аллеля Т отложены по оси у).

• Если значения УОФ неизвестного образца находятся ниже горизонтальной полосы  
40 и правее вертикальной, генотип гомозиготен по аллелю С (УОФ аллеля С отложены по оси х).

• Если значения УОФ неизвестного образца находятся ниже горизонтальной полосы и левее вертикальной, определение генотипа невозможно: в данном случае неопределенный образец - отрицательный контроль.

45 Способ осуществляют следующим образом.

Выделение геномной ДНК из периферической крови осуществляют методом фенольно-хлороформной экстракции в два этапа. На первом этапе к 4 мл крови добавляют 25 мл лизирующего буфера, содержащего 320 мМ сахарозы, 1% тритон X-

100, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM 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 mM ЭДТА (pH 8,0) и 75 mM NaCl, ресуспензируют. Затем прибавляют 0,4 мл 10% SDS, 35 мкл протеиназы К (10 мг/мл) и инкубируют образец при 37°C в течение 16 часов.

На втором этапе из полученного лизата последовательно проводят экстракцию ДНК равными объемами фенола, фенол-хлороформа (1:1) и хлороформа с центрифугированием при 4000 об/мин в течение 10 минут. После каждого центрифугирования производят отбор водной фазы. ДНК осаждают из раствора двумя объемами охлажденного 96%-ного этанола. Сформированную ДНК растворяют в бидистиллированной, деионизованной воде и хранят при -200°C. Выделенную ДНК используют для проведения полимеразной цепной реакции синтеза ДНК.

Анализ всех генетических полиморфизмов интерлейкинов проводят методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК. Для ПЦР используют: ДНК-полимеразу *Thermus aquaticus* производства фирмы «Силекс-М», олигонуклеотидные праймеры и зонды, синтезированные фирмой «Синтол». Полимеразную цепную реакцию выполняют на амплификаторах «Терцик-МС4» (ДНК-технология) и IQ5 (Bio-Rad).

Генотипирование ДНК-маркеров производят следующими методами:

1. Метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (локусы IL-1A -889T>C, IL-1 B -511C>T, IL-5 -703C>T). Генотипирование производят с помощью соответствующих эндонуклеаз. Реакция протекает в присутствии буферов и при температурных условиях, рекомендованных производителями эндонуклеаз - ООО «Сибэнзим» (Новосибирск). Продукты рестрикции фракционируют с помощью электрофореза в агарозных гелях различной концентрации и окрашивают в этидиум бромиде (фиг. 1, 2, 4).

2. Метод дискриминации аллелей согласно значениям величин уровня относительной флуоресценции (УОФ) каждого зонда. Проводят на амплификаторе «CFX96» (локус IL-4 -584C>T) (фиг. 3).

Возможность использования предложенного способа для оценки риска развития ХКХ у мужчин подтверждает анализ результатов наблюдений 249 больных хроническим калькулезным холециститом и 294 человек популяционного контроля. Общий объем исследуемой выборки составил 543 человека. Среди больных ХКХ 16,80% составили мужчины (41 человек), 83,20% - женщины (208 человек). В контрольной выборке (n=294) процентное соотношение было аналогичным: мужчины - 17,00% (50 человек), женщины - 83,00% (244 человек) (p>0,05).

В выборки больных и контроля включались индивидуумы русской национальности Центрального Черноземья России, не связанные между собой родственными связями. Пациентов относили к соответствующей группе больных ХКХ после подтверждения установленного диагноза с помощью клинических и лабораторно-инструментальных методов обследования в соответствии с обязательными диагностическими стандартами. Контрольная группа была сформирована при экспедиционном обследовании населения областей Центрально-Черноземного региона России: Красненского и Прохоровского районов Белгородской области, Репьевского района Воронежской области и Черемисиновского района Курской области.

Типирование молекулярно-генетических маркеров осуществляли в лаборатории «Молекулярной генетики человека» медицинского института Белгородского государственного национального исследовательского университета.

Формирование базы данных и статистические расчеты осуществляли с

использованием программы «STATISTICA 6.0».

Выявление ассоциаций генетических вариантов анализируемых локусов с развитием ХКХ у мужчин проводили с помощью таблиц сопряженности 2x2, на основе вычисления критерия  $\chi^2$  (хи-квадрат) с поправкой Йетса на непрерывность.

5 Характер ассоциаций различных аллелей и генотипов с ХКХ у лиц мужского пола оценивали при помощи показателя отношения шансов (OR) [Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. - [3-е изд.]. - Москва: Медиа Сфера, 2006. - 305 с.]. При  
10 проведении множественных сравнений использовали поправку Бонферрони - производили перерасчет уровня значимости  $p$  для множественных парных сравнений по формуле:  $p_{cor} = p \times n$ , где  $p$  - полученный уровень статистической значимости,  $n$  - количество парных сравнений. За статистически значимый уровень принимали  $p_{bonf} \leq 0,05$ .

15 Изучение роли комбинаций генетических вариантов IL-1A -889T>C, IL-1B -511C>T, IL-4 -584C>T, IL-5 -703C>T в развитии ХКХ у мужчин проводили с помощью программного обеспечения APSampler [<http://sources.redhat.com/cygwin/>], использующего метод Монте-Карло марковскими цепями и байесовскую непараметрическую статистику. Для валидации найденных ассоциаций использовали точный критерий Фишера ( $P_f$ ) и  
20 пермутационный анализ ( $P_{perm}$ ). Значение  $P_{perm}$  для аллеля или аллельного сочетания определяется как вероятность того, что после сбалансированного перемешивания меток «больной ХКХ» - «контроль» (100 пермутаций) и нового поиска с помощью APSampler оценка значимости ассоциации с ХКХ произвольно найденного аллеля или аллельного сочетания будет не хуже, чем эта оценка для исходного. [Царева Е.Ю.  
25 Фармакогеномные исследования эффективности лечения рассеянного склероза иммуномодулирующими препаратами: диссертация... кандидата биологических наук: 03.01.03 / Царева Екатерина Юрьевна // Москва, 2012. - 140 с.]. Значимыми считали различия сравниваемых частот, если  $P_f < 0,05$  и  $P_{perm} \leq 0,005$ , при условии, что значения 95% CI для OR не пересекают 1.

30 Установлена более высокая частота генетических вариантов -511T IL-1B (51,47%), -511TT IL-1B (29,41%), и низкая распространенность генотипа -511CC IL-1B (26,47%) среди мужчин, больных ХКХ, в сравнении с контрольной группой мужчин, где данные показатели составили 23,08% ( $\chi^2=11,47$ ,  $p=0,002$ ), 5,13% ( $\chi^2=6,13$ ,  $p=0,01$ ,  $P_{bonf}=0,03$ ) и  
35 58,97% ( $\chi^2=6,5$ ,  $p=0,01$ ,  $P_{bonf}=0,03$ ) соответственно. Таким образом, генетические варианты -511T IL-1B и -511TT IL-1B обуславливают повышенный риск развития данного заболевания (OR=3,54; 95% CI=1,64-7,67 и OR=7,71; 95% CI=1,39-56,14 соответственно), тогда как генотип -511CC IL-1B является протективным фактором  
40 развития хронического калькулезного холецистита у мужчин (OR=0,25; 95% CI=0,08-0,75).

Выявлена более высокая частота комбинации аллелей -889T IL-1A, -511T IL-1B и -703C IL-5 у больных ХКХ по сравнению с группой контроля. В группе больных данное сочетание встречается в 71,43% случаев, а в контрольной группе лишь в 33,33%. Эта комбинация является фактором риска развития хронического калькулезного холецистита  
45 ( $p_f=0,003$ ;  $p_{perm}=0,01$ ; OR=5,0; 95% CI 1,67-14,93).

Сочетание генетических маркеров -511T IL-1B и -703C IL-5 встречается у 66,67% мужчин, больных ХКХ, что в 1,8 раз чаще, чем в контрольной группе (36,36%). Данная комбинация генетических вариантов интерлейкинов определяет повышенный риск



формирования хронического калькулезного холецистита ( $p_f=0,003$ ;  $p_{perm}=0,01$ ;  $OR=4,8$ ;  $95\% CI 1,64-14,12$ ). Сочетание генетических маркеров -889Т IL-1А, -511Т IL-1 В и -584Т IL-4, которое отмечается у 35,48% мужчин, больных ХКХ, и у 8,33% контроля, также является фактором риска развития данного заболевания ( $p_f=0,004$ ;  $p_{perm}=0,02$ ;  $OR=6,6$ ;  $95\% CI 1,65-26,46$ ).

Зарегистрированы различия между мужчинами, больными ХКХ, и контрольной группой по концентрации сочетания аллелей -889Т IL-1А и -511Т IL-1В. Среди больных данная комбинация встречается у 71,88%, а в контрольной группе лишь у 38,46%.

Наличие данного сочетания является фактором риска развития хронического калькулезного холецистита у мужчин ( $p_f=0,005$ ;  $p_{perm}=0,02$ ;  $OR=4,1$ ;  $95\% CI 1,5-11,17$ ).

Таким образом, резюмируя полученные данные, можно сделать вывод о значимом вкладе полиморфных вариантов генов интерлейкинов IL-1А -889Т>С, IL-1 В -511С>Т, IL-4 -584С>Т, IL-5 -703С>Т и их сочетаний в развитие ХКХ у мужчин. Причем наличие у мужчин аллеля -511Т IL-1 В и генотипа -511ТТ IL-1 В-511Т IL-1 В, -511ТТ IL-1 В, либо комбинации аллелей -889Т IL-1А, -511Т IL-1В и -703С IL-5, либо комбинации аллелей -511Т IL-1 В и -703С IL-5, либо комбинации аллелей -889Т IL-1А, -511Т IL-1 В и -584Т IL-4, либо комбинации аллелей -889Т IL-1А и -511Т IL-1В обуславливает повышенный риск развития ХКХ. Тогда как генотип -511СС IL-1 В является протективным фактором развития хронического калькулезного холецистита у мужчин.

Примеры, подтверждающие осуществимость предложенного изобретения

1. Генетический вариант -511Т IL-1 В был выявлен у пациента К. При дальнейшем обследовании данному пациенту был поставлен диагноз хронический калькулезный холецистит.

2. Генотип -511ТТ IL-1 В был выявлен у пациента А. При дальнейшем обследовании данному пациенту был поставлен диагноз хронический калькулезный холецистит.

3. Генотип -511СС IL-1 В был выявлен у пациента Г. При дальнейшем обследовании у данного пациента хронический калькулезный холецистит не обнаружен.

4. Сочетание аллелей -889Т IL-1А, -511Т IL-1В и -703С IL-5 было обнаружено у пациента Х. При дальнейшем детальном обследовании у этого пациента был обнаружен хронический калькулезный холецистит.

5. Сочетание аллелей -511Т IL-1 В и -703С IL-5 было выявлено у пациента Р. При дальнейшем обследовании данному пациенту был поставлен диагноз хронический калькулезный холецистит.

6. Сочетание аллелей -889Т IL-1А, -511Т IL-1 В и -584Т IL-4 было обнаружено у пациента В. При дальнейшем детальном обследовании у этого пациента был обнаружен хронический калькулезный холецистит.

7. Сочетание аллелей -889Т IL-1А и -511Т IL-1В было выявлено у пациента П. При дальнейшем обследовании данному пациенту был поставлен диагноз хронический калькулезный холецистит.

Использование данного способа позволяет прогнозировать риск развития ХКХ у индивидуумов мужского пола русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья России, что будет способствовать более эффективной реализации лечебно-профилактических мероприятий по предупреждению формирования данного заболевания.

#### Формула изобретения

Способ прогнозирования риска развития хронического калькулезного холецистита (ХКХ) у мужчин русской национальности, являющихся уроженцами Центрального

Черноземья России, включающий забор крови, отличающийся тем, что после выделения ДНК из периферической венозной крови методом фенольно-хлороформной экстракции проводят анализ полиморфизмов генов интерлейкинов IL-1A -889Т>С, IL-1В -511С>Т, IL-4 -584С>Т, IL-5 -703С>Т и прогнозируют повышенный риск развития ХКХ в случае выявления генетических вариантов -511Т IL-1В, -511ТТ IL-1В, либо комбинации аллелей -889Т IL-1А, -511Т IL-1В и -703С IL-5, либо комбинации аллелей -511Т IL-1В и -703С IL-5, либо комбинации аллелей -889Т IL-1А, -511Т IL-1В и -584Т IL-4, либо комбинации аллелей -889Т IL-1А и -511Т IL-1В, прогнозируют низкий риск развития данного заболевания у мужчин в случае выявления генетического варианта -511СС IL-1В.

10

15

20

25

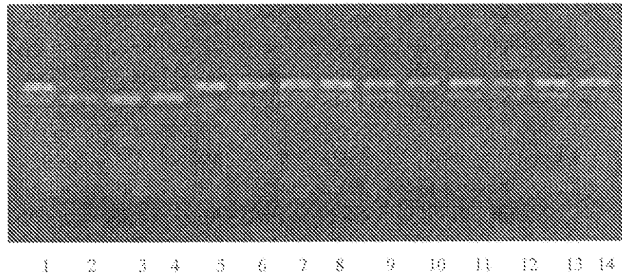
30

35

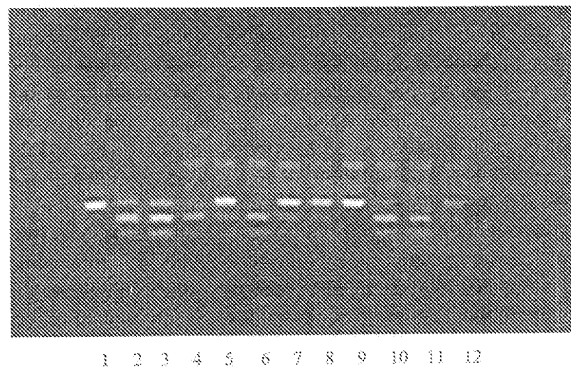
40

45

Способ прогнозирования риска  
развития хронического  
калькулезного холецистита у мужчин

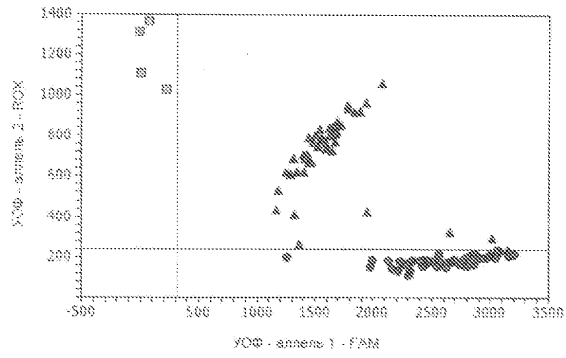


Фиг. 1

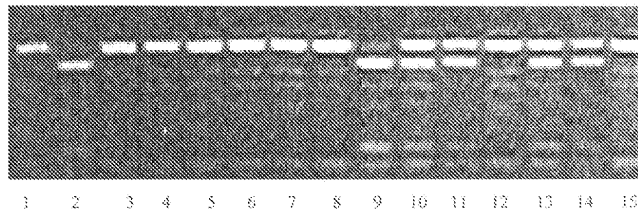


Фиг. 2

Способ прогнозирования риска развития хронического калькулезного холангита у мужчин



Фиг. 3



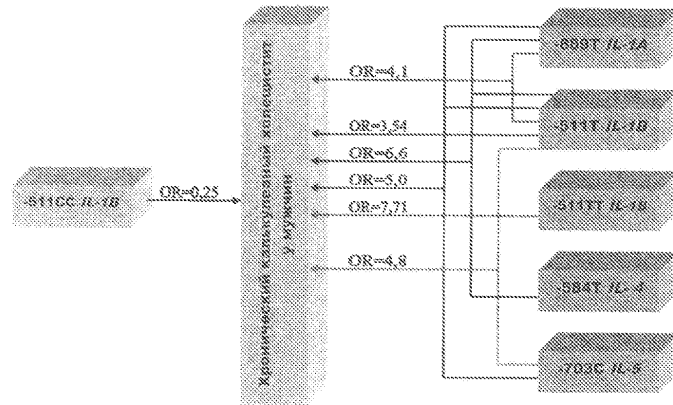
Фиг. 4

Способ прогнозирования риска развития хронического калькулезного холецистита у мужчин

Частоты комбинаций генетических вариантов интерлейкинов у лиц мужского пола, больных хроническим калькулезным холециститом и в контрольной группе							
Полиморфизмы	Сочетание (аллели/генотипы)	Больные ХХХ (n=41)		Контроль (n=50)		P (Fisher)	OR (95% CI)
		n/N	%	n/N	%		
<i>IL-1A -889T&gt;C, IL-1B -511C&gt;T, IL-5 -703C&gt;T</i>	<i>-889T IL-1A, -511T IL-1B и -703C IL-5</i>	20/28	71,43	11/33	33,33	0,003 (0,01)	5,00 (1,67-14,93)
<i>IL-1B -511C&gt;T, IL-5 -703C&gt;T</i>	<i>-511T IL-1B и -703C IL-5</i>	22/30	66,67	12/33	36,36	0,003 (0,01)	4,80 (1,64-14,12)
<i>IL-1A -889T&gt;C, IL-1B -511C&gt;T, IL-4 -584C&gt;T</i>	<i>-889T IL-1A, -511T IL-1B и -584T IL-4</i>	11/31	35,48	3/36	8,33	0,004 (0,02)	6,60 (1,65-26,46)
<i>IL-1A -889T&gt;C, IL-1B -511C&gt;T</i>	<i>-889T IL-1A и -511T IL-1B</i>	23/32	71,88	15/39	38,46	0,005 (0,02)	4,10 (1,50-11,17)

Фиг. 5

Способ прогнозирования риска развития хронического калькулезного холецистита у мужчин



Фиг. 6