



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/50 (2023.08); C12Q 1/6804 (2023.08); C12Q 1/686 (2023.08); C12Q 1/6876 (2023.08)

(21)(22) Заявка: 2023129082, 09.11.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
09.11.2023Дата регистрации:
15.01.2024

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 09.11.2023

(45) Опубликовано: 15.01.2024 Бюл. № 2

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):

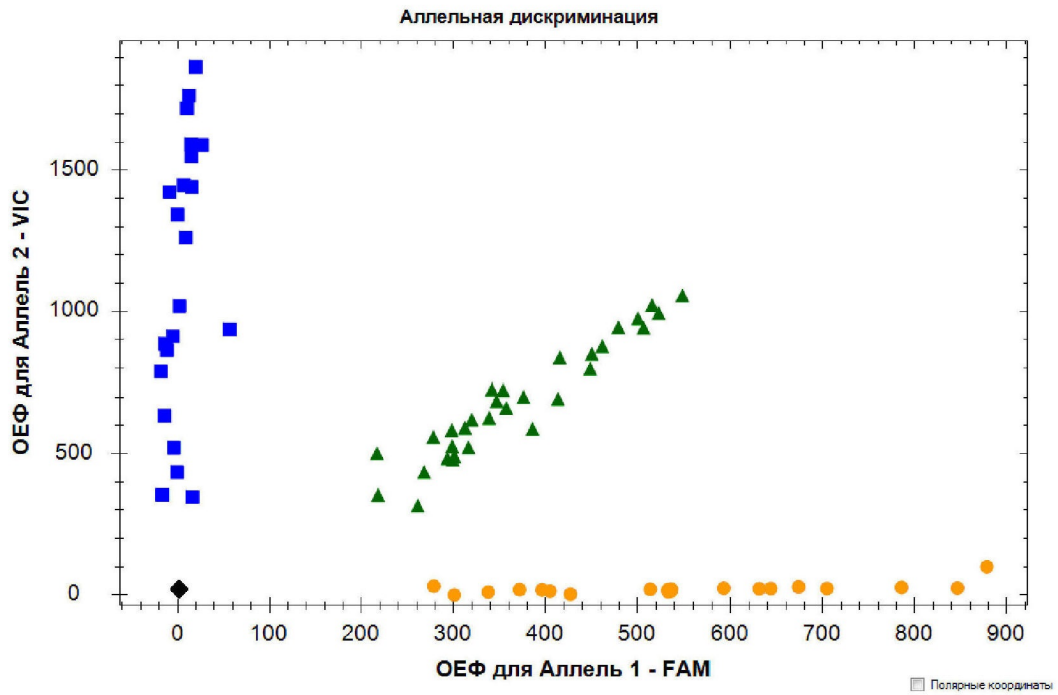
Федеральное Государственное Автономное
Образовательное Учреждение Высшего
Образования "Белгородский
Государственный Национальный
Исследовательский Университет" (НИУ
"БелГУ") (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2786314 C1, 20.12.2022. RU
2563828 C1, 20.09.2015. CN 108060226 A,
22.05.2018. Рашина О.В., Чурносов М. И. Роль
молекул клеточной адгезии в воспалительном
процессе и развитии язвенной болезни желудка
и двенадцатиперстной кишки, их
молекулярно-генетические детерминанты,
Экспериментальная и клиническая
гастроэнтерология, 2022, Том 205 (9), стр.
(см. прод.)

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

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицинской диагностики и может быть использовано для прогнозирования риска развития язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки у женщин на основе молекулярно-генетического тестирования. Способ включает выделение ДНК из лейкоцитов периферической венозной крови и анализ полиморфных локусов rs2294008 PSCA и

rs649129 ABO/RF00019. Высокий риск развития язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки прогнозирует выявление комбинации генотипов rs2294008 PSCA CC × rs649129 ABO/RF00019 CC у неродственных пациентов, уроженцев Центрально-Черноземного региона РФ. 2 ил.



Фиг. 1

(56) (продолжение):

201-208. USUI Y. et al., Impact of PSCA Polymorphisms on the Risk of Duodenal Ulcer, *J Epidemiol*, 2021, Vol. 31 (1), pp. 12-20.

RU 2811577 C1

RU 2811577 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/6804 (2018.01)
C12Q 1/686 (2018.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
G01N 33/50 (2023.08); C12Q 1/6804 (2023.08); C12Q 1/686 (2023.08); C12Q 1/6876 (2023.08)

(21)(22) Application: **2023129082, 09.11.2023**

(24) Effective date for property rights:
09.11.2023

Registration date:
15.01.2024

Priority:

(22) Date of filing: **09.11.2023**

(45) Date of publication: **15.01.2024** Bull. № 2

Mail address:
**308015, g. Belgorod, ul. Pobedy, 85, NIU "BelGU",
Toktareva Tatyana Mikhajlovna**

(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 PREDICTING RISK OF DEVELOPING GASTRIC AND DUODENAL ULCERS IN WOMEN BASED ON MOLECULAR GENETIC TESTING**

(57) Abstract:

FIELD: medical diagnostics.

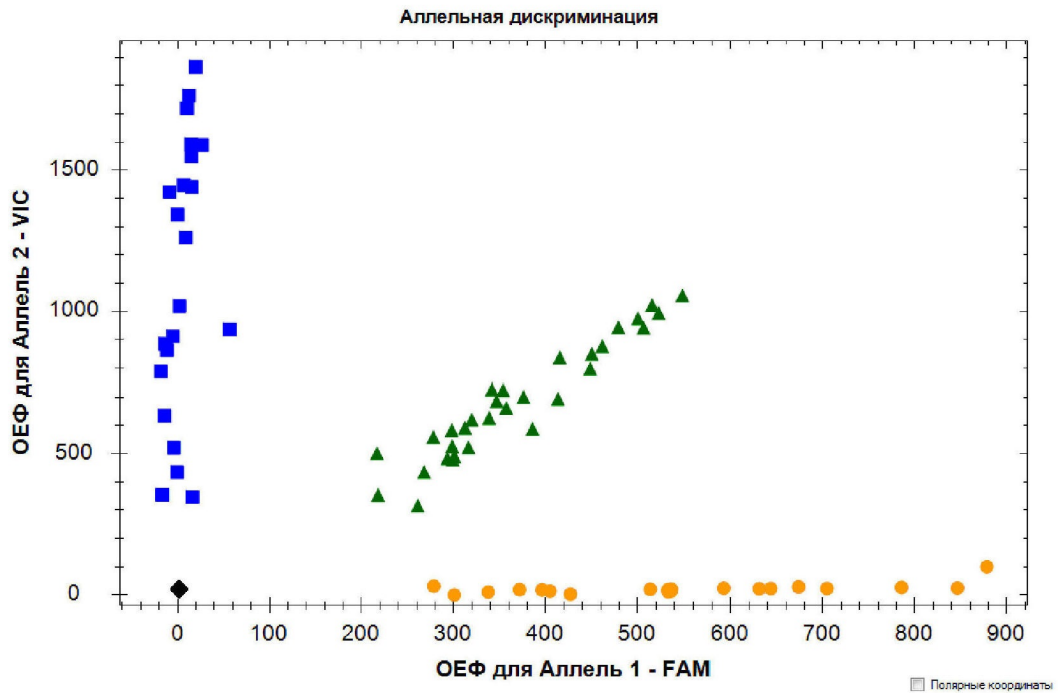
SUBSTANCE: invention can be used to predict the risk of developing gastric and duodenal ulcers in women based on molecular genetic testing. The method involves isolating DNA from peripheral venous blood leukocytes and analyzing the polymorphic loci rs2294008 PSCA and rs649129 ABO/RF00019.

EFFECT: high risk of developing gastric and duodenal ulcers is predicted by the identification of a combination of genotypes rs2294008 PSCA CC × rs649129 ABO/RF00019 SS in unrelated patients, natives of the Central Black Earth region of the Russian Federation.

1 cl, 2 dwg

**C 1
7
5
7
7
2
8
1
1
5
7
7
R U**

**R U
2
8
1
1
5
7
7
C 1**



Фиг. 1

Изобретение относится к области медицинской диагностики и может быть использовано для прогнозирования риска развития язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки у женщин 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). Женщины страдают ЯБ в 2-7 раз реже, чем мужчины (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).

Полиморфный вариант rs2294008 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
25 для ЯБЖ (аллель С, OR=1,13, $p=5,85 \times 10^{-7}$) (Tanikawa C. et al., 2013) и ЯБ ДПК (аллель С, OR=1,34; $p=2,28 \times 10^{-6}$) (Usui Y. et al., 2019), а также среди жителей Испании для ЯБ ДПК (аллель Т, OR=0,52, $p=0,005$) (García-González M.A. et al., 2015).

Ген PSCA (антиген стволовых клеток простаты) экспрессируется в предстательной
30 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
35 процессах, происходящих в слизистой оболочке желудка и 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.,
40 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>).

Varbalic M. et al. (2010) при полногеномном исследовании европейцев обнаружили
45 связь rs649129 с уровнем sICAM-1 ($p=1,22 \times 10^{-15}$). Данные молекулы клеточной адгезии способствуют прочному прикреплению лейкоцитов эндотелия для дальнейшей миграции через сосудистую стенку к очагу воспаления. Следовательно, sICAM-1 играют важную роль в процессе воспаления, в частности при ЯБ (Galustian C. et al., 2003).

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

5 В изученной научно-медицинской и доступной патентной литературе авторами не было обнаружено способа прогнозирования риска развития язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки у женщин русской национальности, на основе данных о комбинации полиморфных локусов rs2294008 PSCA CC × rs649129 ABO/RF00019 CC.

10 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 15 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 20 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 25 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 30 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. 35 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 40 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:

45

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

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

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 желудка и двенадцатиперстной кишки. Недостатком этого способа является то, что он не учитывает роль генетических полиморфизмов.

За прототип выбран патент РФ №2563828 (опубликован 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. Задачей настоящего исследования является расширение арсенала методов диагностики, а именно создание способа прогнозирования риска развития язвенной болезни на основе данных о комбинации полиморфных локусов $rs2294008$ $PSCA$ $CC \times rs649129$ $ABO/RF00019$ CC .

Технический результат использования изобретения - получение критериев оценки риска развития язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки у женщин русской национальности, на основе данных о комбинации полиморфных локусов $rs2294008$ $PSCA$ $CC \times rs649129$ $ABO/RF00019$ CC , включающий:

- выделение ДНК из лейкоцитов периферической венозной крови женщин;
- анализ полиморфных локусов $rs2294008$ $PSCA$ и $rs649129$ $ABO/RF00019$;
- прогнозирование высокого риска развития язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки у женщин на основе данных о комбинации полиморфных локусов $rs2294008$ $PSCA$ $CC \times rs649129$ $ABO/RF00019$ CC .

Новизна и изобретательский уровень заключаются в том, что из уровня техники не известна возможность прогноза развития язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки у женщин с учетом молекулярно-генетического тестирования у индивидуумов русской национальности на основе данных о комбинации полиморфных локусов $rs2294008$ $PSCA$ $CC \times rs649129$ $ABO/RF00019$ 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 $MgCl_2$, 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 PSCA и rs649129 ABO/RF00019 осуществляется 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 полиморфизма rs2294008 PSCA зонд с флуоресцентным красителем VIC соответствует аллелю С, зонд с красителем FAM - аллелю Т (фиг. 1), для rs649129 ABO/RF00019 зонд с флуоресцентным красителем VIC соответствует аллелю С, зонд с красителем FAM - аллелю Т (фиг. 2).

Изобретение характеризуется фигурами.

Фиг. 1. Дискриминации аллелей методом детекции TaqMan зондов по данным величин ОЕФ (относительные единицы флуоресценции) каждого зонда на амплификаторе CFX96 с детектирующей системой в режиме реального времени полиморфизма PSCA rs2294008: ■ - СС, ● - ТТ, ▲ - СТ, ◆ - отрицательный контроль.

Фиг. 2. Дискриминации аллелей методом детекции TaqMan зондов по данным величин ОЕФ (относительные единицы флуоресценции) каждого зонда на амплификаторе CFX96 с детектирующей системой в режиме реального времени полиморфизма ABO/RF00019 rs649129: ■ - СС, ● - ТТ, ▲ - СТ, ◆ - 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 441 женщины: 211 больных язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки и 230 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.

5 Всем пациентам, находящимся под наблюдением, проведено молекулярно-генетическое исследование полиморфных локусов rs2294008 PSCA и rs649129 ABO/RF00019. 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 комбинация полиморфных локусов rs2294008 PSCA CC × rs649129 ABO/RF00019 CC повышает риск развития язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки у женщин ($\beta=1,15$, $p=0,003$).

10 Применение данного способа позволит прогнозировать риск развития язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки у женщин русской национальности, при выявлении комбинации полиморфных локусов rs2294008 PSCA CC × rs649129 ABO/RF00019 CC 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 локусам rs2294008 PSCA и rs649129 ABO/RF00019.

20 У пациентки В. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров были выявлены полиморфные локусы CC rs2294008 PSCA и CC rs649129 ABO/RF00019, что позволило отнести пациентку в группу больных с высоким риском развития язвенной болезни. Дальнейшее наблюдение подтвердило диагноз язвенной болезни у пациентки.

25 У пациентки А. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров были выявлены полиморфные локусы ТТ rs2294008 PSCA и ТТ rs649129 ABO/RF00019, что позволило отнести пациентку в группу индивидумов с низким риском развития язвенной болезни. Дальнейшее наблюдение не подтвердило диагноз язвенной болезни у пациентки.

30 У пациентки Н. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров были выявлены полиморфные локусы ТТ rs2294008 PSCA и СТ rs649129 ABO/RF00019, что позволило отнести пациентку в группу индивидумов с низким риском развития язвенной болезни. Дальнейшее наблюдение не подтвердило диагноз язвенной болезни у пациентки.

35 У пациентки У. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров были выявлены полиморфные локусы СТ rs2294008 PSCA и ТТ rs649129 ABO/RF00019, что позволило отнести пациентку в группу индивидумов с низким риском развития язвенной болезни. При дальнейшем наблюдении диагноз язвенной болезни у пациентки У. не подтвердился.

40 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 женщин.

(57) Формула изобретения

45 Способ прогнозирования риска развития язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки у женщин на основе молекулярно-генетического тестирования, включающий выделение ДНК из лейкоцитов периферической венозной крови и анализ полиморфных локусов rs2294008 PSCA и rs649129 ABO/RF00019, высокий

риск развития язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки прогнозирует выявление комбинации генотипов rs2294008 PSCA CC × rs649129 ABO/RF00019 CC.

5

10

15

20

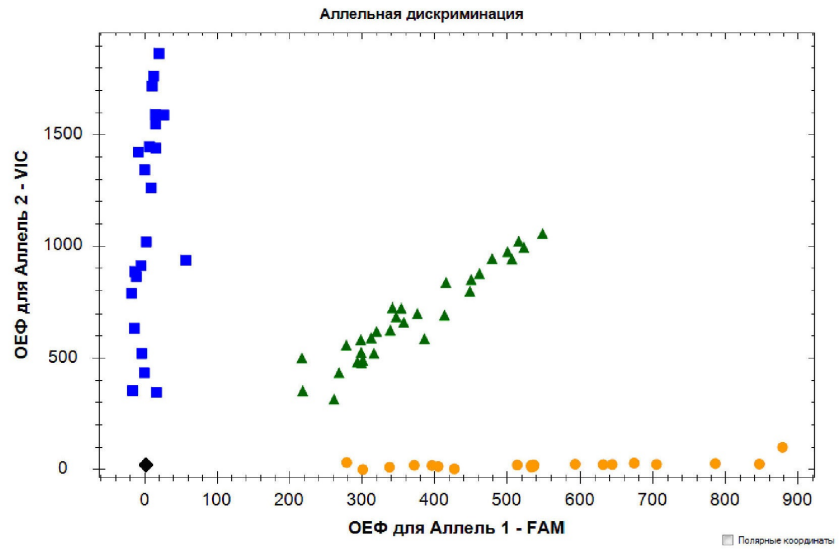
25

30

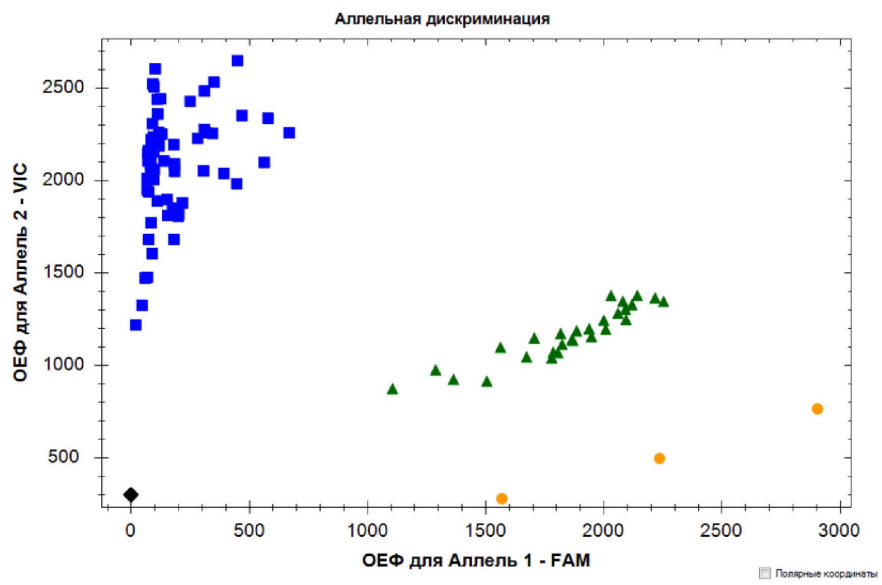
35

40

45



Фиг. 1



Фиг. 2