



(51) МПК
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)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/582 (2022.08); *C12Q 1/6806* (2022.08); *C12Q 1/6827* (2022.08); *C12Q 1/686* (2022.08); *C12Q 1/6876* (2022.08)

(21)(22) Заявка: 2022112311, 06.05.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
06.05.2022

Дата регистрации:
23.11.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 06.05.2022

(45) Опубликовано: 23.11.2022 Бюл. № 33

Адрес для переписки:

450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3,
 БАШГОСМЕДУНИВЕРСИТЕТ, патентный
 отдел, Свирской А.Э.

(72) Автор(ы):

Тюрин Антон Викторович (RU),
 Хусаинова Рита Игоревна (RU),
 Ганцева Халида Ханафиевна (RU),
 Ахиярова Карина Эриковна (RU),
 Садретдинова Лидия Данисовна (RU),
 Ахметова Айгуль Маратовна (RU),
 Миниалина Камила Маликовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное
 образовательное учреждение высшего
 образования "Башкирский государственный
 медицинский университет" Министерства
 здравоохранения Российской Федерации
 (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: RU 2403863 C2, 20.11.2010. EL
 KHOURY L. Genetic and Epigenetic Variation
 within Extracellular Matrix Genes as Risk Factors
 for Human Tendinopathy. Doctoral thesis. The
 University of Northampton. 2015. - 291 p..
 SHARMA A.C. et al. Evaluation of the association
 between a single-nucleotide polymorphism of
 bone morphogenetic proteins 5 gene and risk
 (см. прод.)

(54) Способ прогнозирования развития плоскостопия у молодых лиц

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к внутренним болезням, и может быть использовано для прогнозирования развития плоскостопия у молодых лиц. Проводят выделение ДНК из периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции, генотипирование методом ПЦР локуса rs226794 гена ADAMTS5 и локуса rs1470527 гена BMP5.

При выявлении полиморфного варианта A/G ADAMTS5 rs226794 или C/C BMP5 rs1470527 прогнозируют высокий риск развития плоскостопия. Способ обеспечивает получение новых критериев прогноза риска развития плоскостопия за счет генотипирования локуса rs226794 гена ADAMTS5 и локуса rs1470527 гена BMP5. 1 табл., 3 пр.

(56) (продолжение):

of knee osteoarthritis. J Postgrad Med. 2017 Jul-Sep; 63(3): 151-156.



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)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G01N 33/582 (2022.08); *C12Q 1/6806* (2022.08); *C12Q 1/6827* (2022.08); *C12Q 1/686* (2022.08); *C12Q 1/6876* (2022.08)

(21)(22) Application: **2022112311, 06.05.2022**(24) Effective date for property rights:
06.05.2022Registration date:
23.11.2022

Priority:

(22) Date of filing: **06.05.2022**(45) Date of publication: **23.11.2022 Bull. № 33**

Mail address:

**450008, g. Ufa, ul. Lenina, 3,
BASHGOSMEDUNIVERSITET, patentnyj otdel,
Svirskoj A.E.**

(72) Inventor(s):

**Tiurin Anton Viktorovich (RU),
Khusainova Rita Igorevna (RU),
Gantseva Khalida Khanafievna (RU),
Akhiiarova Karina Erikovna (RU),
Sadretdinova Lidiia Danisovna (RU),
Akhmetova Aigul Maratovna (RU),
Minigalina Kamila Malikovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe biudzhethnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniia «Bashkirskii gosudarstvennyi
meditsinskii universitet» Ministerstva
zdravookhraneniia Rossiiskoi Federatsii (RU)**

(54) **METHOD FOR PREDICTING THE DEVELOPMENT OF FLAT FEET IN YOUNG PEOPLE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine, namely to internal diseases, and can be used to predict the development of flat feet in young people. DNA is isolated from peripheral blood by phenol-chloroform extraction, genotyping by PCR of the rs226794 locus of the ADAMTS5 gene and the rs1470527 locus of the BMP5 gene. When a polymorphic variant A/G

ADAMTS5 rs226794 or C/C BMP5 rs1470527 is detected, a high risk of developing flat feet is predicted.

EFFECT: method provides for obtaining new criteria for predicting the risk of developing flat feet by genotyping the rs226794 locus of the ADAMTS5 gene and the rs1470527 locus of the BMP5 gene.

1 cl, 1 tbl, 3 ex

C 1
2 7 8 4 3 5 4
R U

R U
2 7 8 4 3 5 4
C 1

Изобретение относится к медицине, а именно к внутренним болезням, и может быть использовано для прогноза риска развития плоскостопия.

Плоскостопие - заболевание стопы различной этиологии, характеризующееся таким состоянием, при котором ее подошва вступает в полный или почти полный контакт с поверхностью [Haendlmayer K.T., Harris N.J. Flatfoot deformity: an overview. Orthopedics and trauma, 2009; 23(6): 395-403]. У взрослого населения плоскостопие диагностируют в 15-20% случаев [Uden, H., Scharfbillig, R. and Causby, R., 2017. The typically developing paediatric foot: how flat should it be? A systematic review. Journal of Foot and Ankle Research, 10(1)]. Плоскостопие приводит к нагрузке на нижние конечности, таз и позвоночник, что сопровождается его искривлением, а также выраженным нарушением функционирования опорно-двигательного аппарата. Это обусловлено тем, что при уплощении сводов стопы происходит смещение центра тяжести тела, что неизбежно сказывается на состоянии нижних конечностей, а затем позвоночника и внутренних органах [Чолаков О.Д., Якубова З.А. Плоскостопие как один из факторов нарушений двигательной активности обучающихся. Ученые записки Крымского инженерно-педагогического университета. Серия: Биологические науки. 2020; 1:70-76].

Существует несколько методов диагностики плоскостопия: плантографический метод; компьютерная плантография [Гавриков К.В. Патент №2253363 РФ, МПК А61В. Бюл. 2005, №16]; рентгенологический [Серова Н.С., Беляев А.С., Бобров Д.С., Терновой К.С. Современная рентгенологическая диагностика приобретенного плоскостопия взрослых. Вестник рентгенологии и радиологии. 2017; 98(5):275-280]; педобарография [Кошман Г.А., Мармыш А.Г. Метод педобарографии в оценке функциональных результатов хирургической коррекции нефиксированного плоскостопия у детей. Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2018; 16(1):41-46]; применение индекса позиции стопы (Foot Posture Index (FPI-6)) [Димитриева А.Ю. Клиническая шкала оценки формы и положения стопы FPI-6. Оценка межэкспертной надежности (пилотное исследование). Ортопедия, травматология и восстановительная хирургия детского возраста. 2020; 8(S):17-18]. Однако диагностических инструментов, позволяющих спрогнозировать данное заболевание до проявления клинических признаков, нет.

В доступной научно-медицинской и патентной литературе сведений об известности способа прогнозирования риска развития плоскостопия не обнаружено.

Задачей изобретения является разработка объективного, высокоинформативного метода прогнозирования риска развития плоскостопия у лиц молодого возраста на основании молекулярно-генетического метода.

Технический результат изобретения - получение критериев прогноза риска развития плоскостопия.

Предлагаемый способ прогнозирования развития плоскостопия у молодых лиц осуществляется следующим образом.

40 Выделение геномной ДНК

ДНК из периферической крови выделяют методом фенольно-хлороформной экстракции (Mathew, 1985).

Кровь для исследования набирают в пробирки, содержащие антикоагулянт - К2 или К3 соль ЭДТА, и хранят при температуре 4°C не более одной недели.

45 Для лизиса клеточных мембран и осаждения лейкоцитов к 5 мл крови добавляют 30 мл лизирующего буфера (320 мМ сахарозы, 1% тритон X-100, 5 мМ MDBP₁₂, 10 мМ трис-HCl, pH 7,6) и центрифугируют при 4000 об/мин. и 4°C в течение 20 минут.

Надосадочную жидкость удаляют, к осадку добавляют 20 мл лизирующего буфера

и центрифугируют при тех же условиях в течение 10 мин.

К полученному осадку добавляют 800 мкл буфера Soline ЭДТА (25 мМ ЭДТА, рН 8,0 и 75 мМ NaCl), 80 мкл 10% SDS, 40 мкл протеиназы К (10 мг/мл) и инкубируют при 37°C в течение 16 часов.

5 ДНК экстрагируют в эппендорфах на 2 мл смесью фенол-хлороформа в три этапа, с использованием забуференного фенола (200 мкл меркаптоэтанола на 50 мл фенола - Трис-НСl, рН 7,8), и хлороформ-изоамилового спирта (2 мл изоамилового спирта на 48 мл хлороформа).

10 Далее смешивают лизат и растворитель до образования однородной эмульсии, разделение фаз осуществляют центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 мин с последующим отбором водной фазы после каждого этапа.

ДНК осаждают 96% этанолом. Осадок промывают 70% этанолом, подсушивают при комнатной температуре, затем растворяют в 300 мкл деионизированной воды и хранят при температуре -20°C.

15 Полученный раствор ДНК аликвотируют объемом до 100 мкл в новые пробирки типа эппендорф (600 мкл), и разводят деионизированной водой до концентрации равной 30 нг/мкл.

Концентрацию ДНК и качество полученного раствора оценивают с помощью спектрофотометра NanoDrop (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

20 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Проводят генотипирование локуса rs226794 гена, кодирующего агрекиназу-2 (ADAMTS5), и локуса rs1470527 гена, кодирующего костный морфогенетический белок 5 типа (BMP5). При выявлении полиморфного варианта A/G ADAMTS5 rs226794 или C/C BMP5 rs1470527 прогнозируют высокий риск развития плоскостопия.

25 Для генотипирования локуса rs226794 гена ADAMTS5 и локуса rs1470527 гена BMP5 используют конкурентную аллель-специфичную ПЦР - KASP™.

KASP™ является флуоресцентной методикой для точной идентификации биаллельных полиморфизмов типа SNP, вставок/делеций (от 20-200.000 п.о.).

30 В реакции KASP™ применяют аллель-специфичные праймеры с заданной концевой последовательностью, каждая из которых соответствуют одной из двух FRET (fluorescence resonance energy transfer) - кассет, меченных красителем FAM, или HEX. Распознавание SNP полиморфизма осуществляется за счет конкурентного связывания двух аллель-специфичных прямых праймеров. Использование репортерной системы на основе FRET-кассет исключает применение дорогостоящих меченых зондов и праймеров. Реагенты KASP™ совместимы с любым амплификатором, обеспечивающим 35 детекцию флуоресцентных красителей FAM и HEX, как в режиме реального времени, так и по конечной точке.

Амплификация фрагментов содержащих полиморфизм осуществляют за счет конкурентного связывания одного или двух аллель-специфичных праймеров, с целевой 40 последовательностью и синтеза новых комплементарных последовательностей за счет универсального обратного праймера.

ПЦР с использованием KASP™ технологии проводят в несколько этапов. В ходе первого цикла аллель-специфичный праймер связывается с комплементарной последовательностью ДНК с целевым SNP - например G. При помощи обратного 45 праймера осуществляют амплификацию целевого участка ДНК. В ходе второго цикла обратный праймер связывается, удлиняется и образует комплементарную копию хвостовой последовательности аллеля - 1. В ходе третьего цикла ПЦР FAM-меченный олигонуклеотид связывается с новой хвостовой последовательностью и освобождается

от гасителя. В ходе следующих циклов ПЦР увеличивается количество аллель-специфических концевых последовательностей. Флуоресцентно-меченная часть FRET-кассеты комплементарная новой концевой последовательности связывается, высвобождая краситель от гасителя для генерации флуоресцентного сигнала.

5 На основании независимых оценок точность методики оценивают > 99.8%, а наличие двух видов мастер-микса с низким и стандартным количеством флуоресцентных красителей позволяет использовать стандартные приборы для проведения реал-тайм ПЦР, так и более чувствительные - QuantStudio™ 12K Flex.

10 В качестве приборной базы для KASP™ и TaqMan™ технологии используют амплификатор CFX96 «Termal Cycler 1000» с функцией регистрации продуктов реакции в режиме реального времени, который обладает шестиканальной системой детекции (BioRad) и система для проведения ПЦР в режиме реального времени QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific).

15 Для проведения реакции с использованием реагентов KASP™ используют унифицированный протокол для любого дизайна праймеров, что позволяет стандартизировать используемую методику для работы как с 96 луночными планшетами, так с микро-чипами.

Условия амплификации KASP™ (BioRad/Quant Studio 12K Flex):

20 1. 30 °C – 1 минута – считывание сигнала (Для Quant Studio 12K Flex).

2. 94 °C 15 минут

3. 94 °C 20 секунд

4. 61 °C 60 секунд

5. 94 °C 20 секунд

6. 55 °C 60 секунд

7. 37 °C 60 секунд – считывание сигнала.

30 Помимо стандартных красителей FAM и HEX, в реакционной смеси также используют калибровочный краситель ROX, который не ингибирует ПЦР и не влияет на ее специфичность. Использование данного калибровочного красителя позволяет автоматически нормализовать данные, корректируя погрешности, связанные с ошибкой автоматического дозатора и флуктуацией флуоресценции.

35 Статистическую обработку данных проводят на основании общепринятых методов вариационной статистики с использованием стандартных пакетов Microsoft Excel 2010, Statistica 13.0. При сравнении частот аллелей и генотипов в группах больных и контроля применяют критерий χ^2 . Для таблиц сопряженности 2×2 используют критерий χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность, если частота хотя бы в одной ячейке таблицы была меньше или равна 5. Степень ассоциаций оценивают в значениях показателя отношения шансов (OR).

45 Нами были обследованы ДНК 59 молодых лиц с признаками поперечного плоскостопия и 118 группы контроля без признаков плоскостопия и не имеющие семейного анамнеза плоскостопия. В группе плоскостопия было обнаружена более высокая частота встречаемости полиморфного варианта A/G гена ADAMTS5 rs226794 или генотипа C/C гена BMP5 rs1470527 (таблица).

Полученные показатели OR при наличии рискованных генотипов A/G гена ADAMTS5

rs226794 или генотипа C/C гена BMP5 rs1470527 представлены в таблице.

Изобретения иллюстрируются следующими примерами.

Пример 1. Пациент Л., 18 лет при прохождении медкомиссии в военном комиссариате.

5 Результаты генотипирования: у пациента Л. было взято 4 мл венозной крови с последующим выделением ДНК методом фенол-хлороформной экстракции, генотипирование локуса rs226794 гена ADAMTS5 и локуса rs1470527 гена BMP5 осуществлялось с применением технологии KASP™ на амплификаторе фирмы BioRad. Был выявлен генотип A/G локуса rs226794 гена ADAMTS5, при котором показатель соотношения шансов развития плоскостопия составляет 5,77 (таблица).

10 Вывод: учитывая высокий генетический риск плоскостопия у пациента, были предложены превентивные мероприятия, включающие коррекцию массы тела, расширение двигательной активности, индивидуальный комплекс упражнений для стопы, подбор индивидуальной ортопедической стельки. Данные рекомендации не были выполнены. При обследовании через два года данного пациента было

15 диагностировано плоскостопие.

Пример 2. Пациентка А., 21 год, профессиональная фотомоделль.

Результаты исследования: для генотипирования гена ADAMTS5 rs226794 и гена BMP5 rs1470527 у пациентки А. было взято 4 мл венозной крови с последующим выделением ДНК методом фенол-хлороформной экстракции, генотипирование локуса rs226794

20 гена ADAMTS5 и локуса rs1470527 гена BMP5 осуществлялось с применением технологии KASP™ на амплификаторе фирмы BioRad. При исследовании полиморфного локуса гена BMP5 rs1470527 был выявлен генотип C/C, при котором показатель соотношения шансов развития плоскостопия составляет 2,54 (таблица).

Вывод: учитывая высокий генетический риск плоскостопия у пациентки, были

25 предложены превентивные мероприятия, включающие специальный двигательный режим, индивидуальный комплекс упражнений для стопы, подбор индивидуальной ортопедической стельки, рекомендации по ортопедической обуви. Данные рекомендации не были выполнены. При обследовании через 3 года у данной пациентки было

30 диагностировано плоскостопие.

Пример 3. Пациентка В., 25 лет, на ежегодном профосмотре.

Результаты генотипирования: для генотипирования гена ADAMTS5 rs226794 и гена BMP5 rs1470527 у пациентки В. было взято 4 мл венозной крови с последующим выделением ДНК методом фенол-хлороформной экстракции, генотипирование локуса rs226794 гена ADAMTS5 и локуса rs1470527 гена BMP5 осуществлялось с применением

35 технологии KASP™ на амплификаторе фирмы BioRad. При исследовании полиморфного локуса гена ADAMTS5 rs226794 был выявлен генотип A/A (OR=0,10), а при генотипировании BMP5 rs1470527 был выявлен генотип T/T, при котором показатель соотношения шансов развития плоскостопия составляет 0,68 (таблица).

40 Прогноз в отношении развития плоскостопия благоприятный. В дальнейшем пациентка В. к подологу не обращалась.

Способ прогнозирования развития плоскостопия у молодых лиц

Таблица

Показатели OR при наличии рискованных генотипов A/G гена ADAMTS5 rs226794 или генотипа C/C гена BMP5 rs1470527/генотипа C/C гена BMP5 rs1470527

Выборки	Частоты аллелей		Частоты генотипов		
	ADAMTS5 rs226794				
	A	G	AA	AG	GG
Плоскостопие+ (n=59)	19(0,194)	79(0,806)	2(0,041)	15(0,306)	32(0,653)
Плоскостопие- (n=118)	59(0,331)	119(0,669)	26(0,292)	7(0,079)	56(0,629)
Отношение шансов (OR)	0,49	2,06	0,10	5,17	1,12
р	0,022		0,001		0,93
Доверительный интервал 95%	0,27-0,88	1,14-3,72	0,02-0,46	1,94-13,80	0,54-2,30
Выборки	Частоты аллелей		Частоты генотипов		
	BMP5 rs1470527				
	C	T	CC	CT	TT
Плоскостопие+ (n=59)	70(0,700)	30(0,300)	25(0,500)	20(0,400)	5(0,100)
Плоскостопие- (n=118)	105(0,571)	79(0,429)	26(0,283)	53(0,576)	13(0,141)
Отношение шансов (OR)	1,75	0,57	2,54	0,49	0,68
р	0,044		0,017	0,067	0,66
Доверительный интервал 95%	1,05-2,95	0,34-0,96	1,24-5,20	0,24-0,99	0,23-2,02

(57) Формула изобретения

Способ прогнозирования развития плоскостопия у молодых лиц, характеризующийся тем, что проводят выделение ДНК из периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции, генотипирование методом ПЦР локуса rs226794 гена, кодирующего агрекиназу-2 (ADAMTS5), и локуса rs1470527 гена, кодирующего костный морфогенетический белок 5 типа (BMP5), и при выявлении полиморфного варианта A/G ADAMTS5 rs226794 или C/C BMP5 rs1470527 прогнозируют высокий риск развития плоскостопия.