

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2023 536**
(22) Paraiškos padavimo data: **2023-08-31**
(41) Paraiškos paskelbimo data: **2025-03-10**
(45) Patento paskelbimo data: **2025-04-10**

(73) Patento savininkas:
Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, A. Mickevičiaus g. 9, 44307 Kaunas, LT
(72) Išradėjas:
Juozas KUPČINSKAS, LT
Jurgita SKIECEVIČIENĖ, LT
Darja Nikitina, LT
Rokas Lukoševičius, LT
(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Reda ŽABOLIENĖ, 7, METIDA, Verslo centras „VERTAS“, Gynėjų g. 16, LT-01109 Vilnius, LT

LT 7135 B

(54) Pavadinimas:
***Staphylococcaceae* bakterijų šeimos ir *Staphylococcus* hominis bakterijų rūšies 16S rRNR geno sekų panaudojimas storosios žarnos vėžio diagnostikos būdai iš paciento kraujo plazmos**

(57) Referatas:

Išradime aprašytas storosios žarnos vėžio (SŽV) nustatymo būdas. Šis būdas apima biologinio mėginio paėmimą, laisvai cirkuliuojančios DNR išskyrimą iš biologinio mėginio (kraujo plazmos), *Staphylococcaceae* ir *Staphylococcus* hominis bakterijų sekų nustatymą laisvai cirkuliuojančioje DNR naudojant naujos kartos sekoskaitą, *Staphylococcaceae* ir *Staphylococcus* hominis bakterijų sekų santykinio skaičiaus biologiniame mėginyje paliginimo su referentinėmis reikšmėmis (atitinkamai 9,0 proc. ir 0,3 proc.), jei *Staphylococcaceae* ir *Staphylococcus* hominis bakterijų sekų santykinis skaičius paciento biologiniame mėginyje viršija referentinę reikšmę, pacientui nustatomas SŽV. Būdas pasižymi aukštu jautrumu ir specifiškumu, todėl jis yra perspektyvi alternatyva ankstyvajai SŽV diagnostikai.

TECHNIKOS SRITIS

Šis išradimas priklauso medicinos mokslų sričiai, onkologijai.

TECHNIKOS LYGIS

Storosios žarnos vėžys (SŽV) yra vienas dažniausių vėžio susirgimų pasaulyje. Kasmet diagnozuojama daugiau nei pusė milijono naujų šio susirgimo atvejų. SŽV yra trečia pagal dažnumą onkologinė liga Lietuvoje. Siekiant sumažinti pacientų mirtingumą nuo SŽV svarbu diagnozuoti ligą ankstyvoje stadijoje. Prevencinės SŽV patikros programos vakarų šalyse ir Lietuvoje yra paremtos slapto kraujo nustatymo išmatose testais ir, esant teigiamam rezultatui, po to sekančiu endoskopiniu storosios žarnos tyrimu. Pastarasis tyrimas yra invazinis ir susijęs su dideliais sveikatos priežiūros sistemos kaštais. Šiuo metu SŽV ankstyvos patikros programose naudojami imunocheminiai slapto kraujavimo išmatose testai pasižymi žema diagnostine verte - jų tikslumas nėra pakankamas. Todėl būtina ieškoti naujų molekulinų biožymenų, pasižyminčių lengvu pritaikomumu klinikinėje praktikoje ir aukštu jautrumu bei specifiškumu. Vienas iš išradimo analogų yra metodas, skirtas nustatyti SŽV, naudojant išmatų tyrimą, aprašytas patento paraiškoje WO2019151515A1. Šis metodas pagrįstas subjekto genų esančių išmatose tyrimu tačiau jo jautrumas bei specifiškumas nėra aukštas. Kitas išradimo analogas aprašomas patento paraiškoje WO03059150A2 yra metodas, skirtas nustatyti SŽV, naudojant endoskopinį tyrimą. Šis metodas yra invazinis ir susijęs su dideliais sveikatos priežiūros sistemos kaštais.

Šioje paraiškoje aprašytas metodas yra naujas išradimas, įgalinantis aptikti SŽV ankstyvoje stadijoje, turi aukštą jautrumą ir specifiškumą.

IŠRADIMO ESMĖ

Patentuojamas metodas yra skirtas aptikti SŽV ankstyvoje stadijoje, taip mažinant žmonių mirtingumą nuo šio naviko bei trumpinant gydymo laiką ir mažinant sveikatos apsaugos 2 sistemos ir pacientų išleidžiamus gydymui kaštus. Metodas paremtas naujos kartos sekoskaitos metu nustatytų bakterijų šeimos *Staphylococcaceae* ir bakterijų genties *Staphylococcus hominis* 16S rRNR geno V1-

V2 regiono sekų santykinio skaičiaus padidėjimu (atitinkamai daugiau nei 9 proc. ir daugiau nei 0.3 proc.) kitų bakterijų atžvelgiu panaudojus pacientų kraujo plazmą. Esminiai techniniai reikalavimai siekiant įgyvendinti metodą: paciento kraujo plazma, komercinis DNR gryninimo rinkinys, komercinis PGR atlikimo rinkinys, specifiniai 27F ir 338R pradmenys skirti 16S rRNR geno V1-V2 pagausinimui, komercinis Illumina sekoskaitos rinkinys, kompiuteris su dada2, phyloseq, vegan, R įrankiais.

DETALUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Storosios žarnos vėžiui nustatyti yra naudojamas paciento kraujo plazmos mėginys, iš kurio išgryninama laisvai cirkuliuojanti DNR. PGR būdu, naudojant 27F ir 338R pradmenis, pagausinamas 16S rRNA geno V1-V2 regionas.

NAUJOS KARTOS SEKOSKAITA ATLIEKAMA MISEQ ILLUMINA APARATU

Pasitelkiant bioinformatinius įrankius (*dada2*, *phyloseq*, *vegan*, R) prijungiama naujausia bakterijų duomenų bazė (Silva 132). Visom nustatytoms bakterijų sekoms priskiriami taksonominiai lygiai (tipas, klasė, eilė, šeima, gentis, rūšis). Vėliau sekos apjungiamos į atitinkamas grupes pagal nustatytus taksonominius lygius.

Iš visų nustatytų šeimų išskiriama *Staphylococcaceae*, o iš visų nustatytų rūšių išskiriama *Staphylococcus hominis*. Apskaičiuojamas jų santykinis gausumas (procentais) kitų bakterijų atžvelgiu. *Staphylococcaceae* santykinis gausumas skaičiuojamas Šeimos lygmeniu, o *Staphylococcus hominis* – Rūšies lygmeniu.

Storosios žarnos vėžys yra identifikuojamas, jeigu tirtame mėginyje *Staphylococcaceae* bakterijų šeima, atsižvelgiant į kitas bakterijų šeimas taip pat nustatytas tame mėginyje, viršija 9,0 proc. o *Staphylococcus hominis* bakterijų rūšis, atsižvelgiant į kitas bakterijų rūšis taip pat nustatytas tame mėginyje, viršija 0,3 proc.

Šis būdas pasižymi aukštu jautrumu ir specifiškumu (AUC = 73 proc.), todėl jis yra perspektyvus naujas būdas ankstyvai SŽV diagnostikai.

SŽV sergančiųjų ir kontrolinių asmenų kraujo mėginiai buvo surinkti 2013-2022 metais Gastroenterologijos ir Chirurgijos skyriuose (Kauno klinikos, Lietuvos

sveikatos mokslų universiteto ligoninė) ir saugoti biobanke – 80 °C temperatūroje. Kraujo plazmos bakterijų 16S rRNR analizei buvo panaudoti 56 SŽV ir 66 kontrolinės grupės pacientų mėginiai. Kontrolinę grupę sudarė pacientai, kuriems nenustatyti jokie piktybiniai navikai, SŽV grupės pacientams liga buvo diagnozuota atlikus histologinį tyrimą.

BAKTERINĖS DNR GRYNINIMAS IŠ KRAUJO PLAZMOS

Siekiant išgryninti bakterinės kilmės DNR frakciją, esančią žmogaus kraujyje, pirmiausiai buvo skiriama visa laisvai kraujyje cirkuliuojanti DNR (lc-DNR). Lc-DNR buvo išgryninta iš periferinio kraujo plazmos (500 µl) naudojant *QIAamp MinElute ccfDNA Mini Kit (Qiagen)* rinkinį pagal gamintojo pateiktą protokolą. DNR koncentracija išmatuota *Bioanalyzer 2100 (Agilent)* bei *Qubit* analizatoriais.

16S RRNR GENO SEKOSKAITOS BIBLIOTEKŲ PARUOŠIMAS IR SEKOSKAITA

Siekiant iš visos išskirtos laisvai cirkuliuojanti DNR (lc-DNR) atskirti tik bakterinę frakciją, PGR metodu, naudojant 27F-338R pradmenis, buvo pagausintas tik bakterijoms būdingas 16S rRNR genas. PGR reakcijos efektyvumas (produkto susidarymas) buvo įvertinti agarozės gelyje. Tolimesnei analizei tinkantys mėginiai, siekiant suvienodinti koncentraciją, buvo normalizuoti naudojant *SequalPrep* rinkinį (Thermo Fisher). Po normalizacijos mėginiai buvo apjungti į vieną biblioteką ir pasinaudojant *Illumina MiSeq (Illumina)* platforma buvo atlikta paruoštos bibliotekos sekoskaita. Lc-DNR mėginių taršai įvertinti kiekvieną kartą gryninant tiriamųjų mėginių seriją, kaip neigiama kontrolė, buvo panaudoti vandens mėginiai, iš kurių buvo gryninama DNR bei atlikta PGR ir sekoskaita.

16S RRNA SEKOSKAITOS DUOMENŲ BIOINFORMATINĖ IR STATISTINĖ ANALIZĖ

Sekoskaitos duomenys išanalizuoti naudojant *dada2* ir *phyloseq* algoritmus R programoje. Nustatytos sekos buvo kiekybiškai ir kokybiškai įvertintos ir tolimesnei analizei paliktos tik kokybės rekomendacijas atitinkančios sekos. Sekos, rastos

kontroliniuose vandens mėginiuose, įtariant užterštumą buvo pašalintos iš tyrimo, naudojant *decontam* paketą. Nustatytoms sekoms buvo priskirta taksonominė klasifikacija, naudojant naujausią SILVA bakterijų duomenų bazę (138 versija). Mėginiai su nuskaitymo lygiu mažesniu nei 500 buvo 4 pašalinti iš analizės. Duomenų normalizavimas ir β -įvairovės analizė buvo atlikta naudojant DESeq2 paketą. β -įvairovės analizė buvo atlikta tik su bakterijomis, kurios buvo aptinkamos daugiau nei 25 proc. mėginių, bent vienoje iš lyginamųjų grupių. Visuose testuose skirtumai buvo laikomi statistiškai reikšmingais, kai koreguota dauginio palyginimo p vertė (p.adj) buvo $< 0,05$.

REZULTATAI

Vertinant kraujo plazmoje esančias bakterijas, kaip biožymenį, rinkinys iš dviejų bakterijų taksonominių vienetų – *Staphylococcus hominis* sekos (ASV 8) ir šeimos *Staphylococcaceae* kaip biožymens jautrumas siekė 68 proc., o specifiškumas – 83 proc., jautrumo ir specifiškumo sąryšis 73 proc.. Sergančiųjų kraujo plazmos mėginiuose *Staphylococcaceae* bakterijų šeima atsižvelgiant į kitas bakterijų šeimas viršijo 9 proc. o *Staphylococcus hominis* bakterijų rūšis atsižvelgiant į kitas bakterijų rūšis viršijo 0.3 proc. tai traktuojama kaip SŽV požymis.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Storosios žarnos vėžio (SŽV) nustatymo būdas, naudojant tikslius molekulinis žymenis, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad būdas apima *Staphylococcaceae* ir *Staphylococcus hominis* bakterijų 16S rRNR geno V1-V2 regiono nustatytų sekų santykinio skaičiaus procentais nustatymą, naudojant naujos kartos sekoskaitą.

2. Storosios žarnos vėžio (SŽV) nustatymo būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad yra nustatomas *Staphylococcaceae* (daugiau nei 9 proc.) ir *Staphylococcus hominis* (daugiau nei 0,3 proc.) bakterijų sekų santykinis skaičius, pagal kurį yra identifikuojamas storosios žarnos vėžys (SŽV).

3. Storosios žarnos vėžio (SŽV) nustatymo būdas pagal 1 ir 2 punktus, skirtas panaudoti nustatant storosios žarnos vėžį (SŽV).