



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/582 (2020.08); C12Q 1/6827 (2020.08); C12Q 1/6876 (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2020126895, 11.08.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
11.08.2020Дата регистрации:  
15.12.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 11.08.2020

(45) Опубликовано: 15.12.2020 Бюл. № 35

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

Чурносов Михаил Иванович (RU),  
Головченко Олег Васильевич (RU),  
Абрамова Мария Юрьевна (RU),  
Пономаренко Ирина Васильевна (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 2557952 C1, 27.07.2015. WO  
2019222812 A1, 28.11.2019. CN 0109754884 B,  
08.05.2020.

(54) Способ прогнозирования веса новорожденного у беременных с преэклампсией и отягощенным семейным анамнезом по преэклампсии

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и предназначено для прогнозирования веса новорожденного у беременных русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья России, с преэклампсией и отягощенным семейным анамнезом по преэклампсии. Осуществляют выделение ДНК из периферической венозной крови и анализ полиморфизма фактора роста эндотелия сосудов А – rs833061 VEGFA. При выявлении аллеля Т полиморфизма rs833061 гена VEGFA прогнозируют нормальный вес

новорожденного. При выявлении аллеля С полиморфизма rs833061 гена VEGFA прогнозируют низкий вес новорожденного. Изобретение обеспечивает получение критериев оценки прогноза веса новорожденного у беременных русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья, имеющих преэклампсию и отягощенный семейный анамнез по преэклампсии на основе данных о полиморфизме rs833061 гена VEGFA. 1 ил., 4 пр.

RU 2 738 685 C1

RU 2 738 685 C1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11)**2 738 685**<sup>(13)</sup> **C1**

(51) Int. Cl.  
*G01N 33/50* (2006.01)  
*C12Q 1/6827* (2018.01)

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*G01N 33/582 (2020.08); C12Q 1/6827 (2020.08); C12Q 1/6876 (2020.08)*(21)(22) Application: **2020126895, 11.08.2020**(24) Effective date for property rights:  
**11.08.2020**Registration date:  
**15.12.2020**

Priority:

(22) Date of filing: **11.08.2020**(45) Date of publication: **15.12.2020 Bull. № 35**

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

**Churnosov Mikhail Ivanovich (RU),  
Golovchenko Oleg Vasilevich (RU),  
Abramova Mariya Yurevna (RU),  
Ponomarenko Irina Vasilevna (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 NEWBORN'S WEIGHT IN PREGNANT WOMEN WITH PRE-ECLAMPSIA AND A FAMILY HISTORY OF PRE-ECLAMPSIA**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine and is intended to predict of newborn's weight in pregnant Russian nationals, who are natives of Central Black Earth Region of Russia, with preeclampsia and a burdened pre-eclampsia family history. DNA is recovered from peripheral venous blood and analyzed polymorphism of vascular endothelium growth factor A - rs833061 VEGFA. If observing an allele of T polymorphism rs833061 of the VEGFA gene, the

normal weight of the newborn is predicted. If observing allele C polymorphism rs833061 of VEGFA gene low birth weight is predicted.

EFFECT: invention provides the criteria for estimating the prediction of the newborn's birth weight in pregnant Russian nationals, who are natives of the Central Black Earth Region, having preeclampsia and a burdened family history of preeclampsia on the basis of data on polymorphism rs833061 of the VEGFA gene.

1 cl, 1 dwg, 4 ex

RU 2 738 685 C1

RU 2 738 685 C1

Изобретение относится к области медицинской диагностики, может быть использовано для прогнозирования веса новорожденного у беременных женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья России, с преэклампсией (далее ПЭ) и отягощенным семейным анамнезом по преэклампсии.

- 5 Антропометрические параметры (вес, рост) являются одними из ключевых показателей состояния новорожденного, которые, во-первых, характеризуют течение прошедшей беременности - эмбриональный рост, как известно, является важным показателем исхода беременности и отражает взаимодействие физиологических и патологических факторов, влияющих на плод в течении внутриутробного развития
- 10 [Плацентарная недостаточность: Патогенез. Прогнозирование. Диагностика. Профилактика. Акушерская тактика [Текст]/ Стрижаков А.М., Липатов И.С., Тезиков Ю.В. // Самара: ООО «ОФОРТ». 2014. - 239 с.]. По данным ВОЗ среднее значение массы новорожденного составляет 3200 г. для девочек и 3300 г. для мальчиков, дети с массой менее 2500 г. считаются плодами с низкой массой при рождении [<https://www.who.int/ru/>]
- 15 ]. Нередко такие осложнения беременности как плацентарная недостаточность и преэклампсия приводят к рождению маловесных детей и в ряде случаев к развитию задержки роста плода [Intrauterine Growth Restriction: Antenatal and Postnatal Aspects [Text]/ Sharma D, Shastri S, Sharma P// Clinical Medicine Insights: Pediatrics. 2016;10:67-83.]. Во-вторых, низкий вес у новорожденных, является известным фактором риска
- 20 перинатальной заболеваемости (развитие дистресс-синдрома, мекониальной аспирации, некротизирующего энтероколита и др.) и смертности [Neonatal Morbidities of Fetal Growth Restriction: Pathophysiology and Impact [Text]/ Malhotra A, Allison BJ, Castillo-Melendez M, Jenkin G, Polglase GR, Miller SL. // Front Endocrinol (Lausanne). 2019;10:55.]. В-третьих, у маловесных детей повышен риск развития различных заболеваний (сердечно-сосудистых,
- 25 дислипидемии, метаболического синдрома и др.) во взрослой жизни [Intrauterine Growth Restriction: Hungry for an Answer [Text]/ Devaskar SU, Chu A.// Physiology (Bethesda). 2016; 31(2):131–146.; Молекулярно-генетические и эпигенетические аспекты нарушения рецептивности эндометрия у женщин с низкой массой тела при рождении [Текст]/ Мелкозерова О.А., Башмакова Н.В., Третьякова Т.Б., Щедрина И.Д.// Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2019; 18(4): 35–43].

Согласно данным литературы важное значение в формировании антропометрических характеристик новорожденного (вес, рост) имеют материнские факторы (сосудистые и метаболические заболевания, тромбофилические состояния, нарушения питания, лекарственные препараты и др.) [Fetal growth restriction: current knowledge.Nardozza [Text]/

35 L. M. M., Caetano, A. C. R., Zamarian, A. C. P., Mazzola, J. B., Silva, C. P., Marçal, V. M. G., et al.// Arch. Gynecol. Obstet. 2017. 295, 1061–1077] и в том числе генетические детерминанты материнского организма [Genetic markers for inherited thrombophilia are associated with fetal growth retardation in the population of Central Russia [Text]/ Reshetnikov E, Zarudskaya O, Polonikov A, Bushueva O, Orlova V, Krikun E, Dvornyk V, Churnosov M.//

40 J. Obstet. Gynaecol. Res.// 2017;43(7):1139-1144]. В исследованиях последних лет (в том числе выполненных на полногеномном уровне) показана связь полиморфизма ряда генов-кандидатов «материнского» генома с ростом и весом новорожденного [Genome-wide associations for birth weight and correlations with adult disease [Text]/ Horikoshi M. et al.// Nature. 2016. 538(7624): 248–252].

45 Из области техники известен «Способ оценки функционального состояния плода с использованием кардиотокографии» по патенту РФ № 2628240 от 15.07.2016. Способ включает выполнение кардиотахографии и анализ полученных кардиотахограмм с определением характеристик частоты сердечного сокращения (ЧСС) и выделением

одного из трех типов кардиотахограмм, соответствующих состояниям плода: нормального, подозрительного и патологического. Оценку проводят во II триместре беременности по показателям: кратковременная вариабельность сердечного ритма, долговременная вариабельность сердечного ритма, эпизоды высокой вариабельности, эпизоды низкой вариабельности, децелерации. Критерием нормального типа кардиотахограммы плода является одновременное достижение следующих нормальных значений показателей: кратковременная вариабельность сердечного ритма - не менее 3,5 мс, долговременная вариабельность сердечного ритма - не менее 37 мс, эпизоды высокой вариабельности - более 5 мин, эпизоды низкой вариабельности - не более 4 мин, децелерации - не более 3. Критерием подозрительного типа кардиотахограммы плода является отклонение от нормального значения по меньшей мере одного из показателей: эпизоды высокой вариабельности, эпизоды низкой вариабельности, децелерации. Критерием патологического типа кардиотахограммы является выявление по крайней мере одного из условий: отклонение от нормы кратковременной вариабельности сердечного ритма; отклонение от нормы долговременной вариабельности сердечного ритма; одновременно эпизоды высокой вариабельности составляют менее 5 мин, эпизоды низкой вариабельности составляют более 5 мин, децелерации более 3; одновременно эпизоды высокой вариабельности составляют 0, эпизоды низкой вариабельности составляют более 5 мин, децелерации более 3. Способ позволяет прогнозировать и выявлять во II триместре беременности патологии плода, связанные с плацентарной недостаточностью, в т.ч. задержку внутриутробного развития. Недостатками данного способа являются: 1) возможность использования только во II триместре беременности; 2) способ не включает генетические маркеры, что исключает раннюю диагностику и проведение профилактических мероприятий по предотвращению рождения маловесных детей.

За прототип выбран патент РФ № 2557952 по заявке № 2014124787/15 от 18.06.2014 «Способ прогнозирования веса новорожденного с учетом полиморфных вариантов локуса 10976 G/A FVII». Способ включает выделение ДНК из периферической венозной крови и проведение анализа полиморфизма генов VII фактора коагуляции 10976 G/A FVII. Вес тела новорожденного при рождении прогнозируют на сроке 37 и более недель беременности у женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья России. У женщин, рожаящих не в первый раз, вес тела новорожденного определяют по уравнению:  $y=6123,431-25,579x_1+0,267x_2+205,739x_3$ , где  $y$  - прогнозируемый вес новорожденного,  $x_1$  - рост женщины в сантиметрах;  $x_2$  - вес ребенка в предыдущих родах в граммах,  $x_3$  - генетический вариант локуса 10976G/A FVII, при этом  $x_3=1$  для генотипа 10976 GG FVII,  $x_3=2$  для генотипов 10976 GA и 10976 AA FVII. У первородящих женщин вес тела новорожденного определяют по уравнению:  $y=6278,037-21,739x_1+232,170x_2$ , где  $x_1$  - рост женщины в сантиметрах;  $x_2$  - генетический вариант локуса 10976 G/A FVII, при этом  $x_2=1$  для генотипа 10976 GG FVII,  $x_2=2$  для генотипов 10976 GA и 10976 AA FVII. Недостатком способа является невозможность прогнозирования веса новорожденного на ранних сроках беременности у женщин с ПЭ, которые относятся к группе высокого риска по рождению детей с низкой массой тела.

Задачей настоящего исследования является расширение арсенала способов прогнозирования веса новорожденного, а именно создание способа прогнозирования веса новорожденного у беременных с ПЭ и имеющих отягощенный семейный анамнез по ПЭ.

Технический результат использования изобретения – получение критериев оценки

прогноза веса новорожденного у беременных русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья, имеющих преэклампсию и отягощенный семейный анамнез по ПЭ на основе данных о полиморфизме rs833061 гена VEGFA.

Поставленную задачу решает предложенный способ, включающий:

- 5 - выделение ДНК из периферической венозной крови;
- анализ полиморфизма гена фактора роста эндотелия сосудов А rs833061 VEGFA;
- прогнозирование веса новорожденного: при выявлении аллеля Т полиморфизма rs833061 гена VEGFA прогнозируется рождение плода с нормальной массой тела. При выявлении аллеля С rs833061 VEGFA прогнозируется низкая масса новорожденного.

10 Новизна и изобретательский уровень заключаются в том, что из уровня техники не известна возможность прогнозирования веса новорожденного у беременных с преэклампсией и отягощенным семейным анамнезом по ПЭ с учетом полиморфизма rs833061 гена VEGFA.

Способ осуществляют следующим образом:

- 15 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, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ трис-НСl с рН=7,6. Полученную смесь перемешивают и центрифугируют при 4°С, 4000 об./мин. в течение 20 минут. После
- 20 центрифугирования надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют 4 мл раствора, содержащего 25 мМ ЭДТА с рН=8,0 и 75 мМ NaCl, ресуспензируют. Затем прибавляют 0,4 мл 10% SDS, 35 мкл протеиназы К, 10 мг/мл, и инкубируют образец при 37°С в течение 16 часов.

На втором этапе из полученного лизата последовательно проводят экстракцию ДНК

25 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 минус 200°С.

30 Выделенную ДНК используют для проведения полимеразной цепной реакции синтеза ДНК.

Анализ полиморфизма гена фактора роста эндотелия сосудов А rs833061 VEGFA проводят методом ПЦР-синтеза ДНК на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad) с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров и зондов с последующим

35 анализом полиморфизма методом дискриминации аллелей. Реакционная смесь объемом 25 мкл включает: 67 мМ трис-НСl с рН=8,8, 2,5мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1 мкг геномной ДНК, по 10 пМ каждого праймера, по 5 пкмоль каждого зонда, по 200 мкМ dATP, dGTP, dCTP, dTTP и 1 единицу активной Taq-полимеразы. После денатурации в течение 5 мин при 95°С выполняют 40 циклов амплификации по схеме: отжиг праймеров – 1 мин. при t=

40 54°С; денатурация – 15 сек при t=95°С. При проведении ПЦР в амплификаторе CFX96 с флуоресцентной детекцией генотипирование осуществляют методом Tag Map зондов по данным величин ОЕФ (относительные единицы флуоресценции). Для rs833061 VEGFA зонд с флуоресцентным красителем ROX соответствует аллелю С, зонд с красителем FAM – аллелю Т (фиг.1).

45 Генотипирование полиморфизма rs833061 гена VEGFA осуществляют методом детекции TagMap зондов по данным величин ОЕФ (относительные единицы флуоресценции) каждого зонда на амплификаторе CFX96 с детектирующей системой в режиме реального времени.

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 VEGFA (rs833061): - СС, - ТТ, - СТ, • - отрицательный контроль.

Для изучения ассоциации полиморфного локуса rs833061 VEGFA с весом новорожденного использовался лог-линейный регрессионный анализ (рассматривались аллельная, аддитивная, рецессивная и доминантная генетические модели). Вычисления проводились в программе PLINK v. 2.050 (<http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/>). Рассчитывались коэффициенты регрессии ( $\beta$ ) и их ошибки (SE), характеризующие направленность изменения изучаемого количественного показателя (веса новорожденного) на один полиморфный генетический вариант (минорный аллель).

Возможность использования предложенного способа прогнозирования веса новорожденного у беременных с преэклампсией и отягощенным семейным анамнезом по ПЭ подтверждает анализ результатов наблюдений 190 пациенток с преэклампсией (средний возраст  $26,88 \pm 5,37$  лет). В исследуемую группу включались женщины русской национальности, являющиеся уроженками Центрального Черноземья России и не имеющие родства между собой. Диагноз преэклампсия ставился на основании наличия: отеков, артериальной гипертензии и протеинурии. К критериям исключения были отнесены: заболеваниями матки (фибромиома матки, аномалии развития внутренних половых органов), другая патология беременности (аномалии прикрепления и расположения плаценты, задержка роста плода, резус-конфликт), патологией плода (ВПР), многоплодная беременность. Клиническое и клинико-лабораторное обследование беременных проводилось на сроке родоразрешения на базе перинатального центра Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа. Соматометрия новорожденных проводилась стандартными методами. Типирование молекулярно-генетических маркеров осуществлялось в лаборатории «Молекулярной генетики человека» медицинского факультета Белгородского государственного национального исследовательского университета. Данное исследование проводилось под контролем этического комитета медицинского факультета НИУ БелГУ (от каждой женщины, включенной в исследование, было получено информированное согласие).

При проведении лог-линейного регрессионного анализа установлена ассоциация полиморфизма rs833061 гена VEGFA с весом новорожденного у женщин с преэклампсией и отягощенным семейным анамнезом: минорный аллель Т полиморфизма rs833061 гена VEGFA достоверно связан с рождением плода с нормальной массой тела (для аллельной модели  $\beta = 0,171$ ,  $p=0,003$ ,  $p_{perm}=0,005$ , аддитивной модели  $\beta = 0,176$ ,  $p=0,002$ ,  $p_{perm}=0,002$ , доминантной модели  $\beta = 0,212$ ,  $p=0,02$ ,  $p_{perm}=0,02$ , рецессивной модели  $\beta = 0,248$ ,  $p=0,008$ ,  $p_{perm}=0,009$ ); референсный аллель С rs833061 VEGFA - ассоциирован с низким весом новорожденных. При наличии у женщины генотипа ТТ полиморфизма rs833061 вес новорожденного максимальный, а при определении генотипа СС – вес новорожденного минимальный.

Примеры использования предлагаемого способа.

Пример 1. У беременной женщины А., установлен диагноз: преэклампсия средней тяжести. Из истории болезни определено наличие отягощенного семейного анамнеза. По данным молекулярно-генетического обследования выявлен генотип ТТ полиморфизма rs833061 VEGFA, что позволило отнести ее в группу беременных с низким риском рождения плода с низкой массой тела. Дальнейшее наблюдение за данной пациенткой показало, что вес новорожденного, родившегося на сроке 40-41

недель, составил 3350 грамм.

Пример 2. У беременной женщины В. установлен диагноз: преэклампсия средней тяжести. Из истории болезни определено наличие отягощенного семейного анамнеза. По данным молекулярно-генетического обследования определен генотип СТ полиморфизма rs833061 гена VEGFA, что позволило отнести ее в группу с повышенным риском рождения плода с низкой массой тела. Дальнейшее наблюдение за данной пациенткой показало, что вес новорожденного, родившегося на сроке 38-39 недель, составил 2600 грамм.

Пример 3. У беременной женщины З. установлен диагноз: тяжелая преэклампсия. Из истории болезни определено наличие отягощенного семейного анамнеза. По данным молекулярно-генетического обследования установлен генотип СС полиморфизма rs833061 VEGFA, что позволило отнести ее в группу высокого риска рождения плода с низкой массой тела. Дальнейшее наблюдение за данной пациенткой показало, что вес новорожденного, родившегося на сроке 37-38 недель, составил 2150 грамм.

Пример 4. У беременной женщины Л. установлен диагноз: преэклампсия средней тяжести. Из истории болезни определено наличие отягощенного семейного анамнеза. По данным молекулярно-генетического обследования выявлен генотип СТ полиморфизма rs833061 VEGFA, что позволило отнести ее в группу беременных с повышенным риском рождения плода с низкой массой тела. Дальнейшее наблюдение за данной пациенткой показало, что вес новорожденного, родившегося на сроке 39-40 недель, составил 2500 грамм.

Таким образом, предложенный способ дает возможность прогнозирования веса новорожденного у женщин с преэклампсией русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья России и имеющих отягощенный семейный анамнез по ПЭ, с учетом полиморфизма rs833061 гена VEGFA.

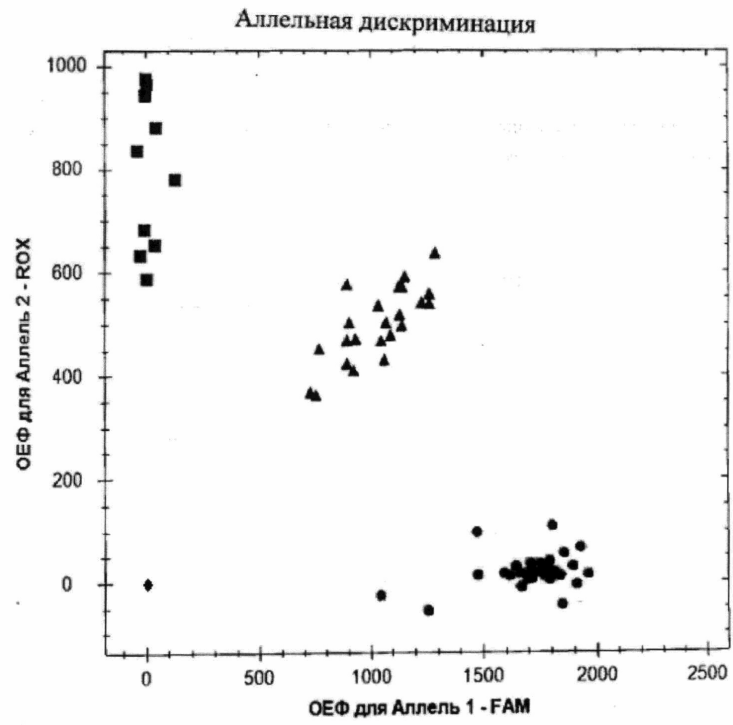
Прогнозирование рождения детей с низкой массой поможет улучшить комплекс мероприятий, направленных на профилактику и лечение данного осложнения беременности, что позволит улучшить перинатальные исходы.

(57) Формула изобретения

Способ прогнозирования веса новорожденного у беременных русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья России, с преэклампсией и отягощенным семейным анамнезом по преэклампсии, включающий выделение ДНК из периферической венозной крови, анализ полиморфизма фактора роста эндотелия сосудов А – rs833061 VEGFA, прогнозирование нормального веса новорожденного при выявлении аллеля Т полиморфизма rs833061 гена VEGFA, прогнозирование низкого веса новорожденного при выявлении аллеля С полиморфизма rs833061 гена VEGFA.

40

45



Фиг. 1