



(51) МПК
G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)
C12Q 1/6827 (2018.01)
C12Q 1/686 (2018.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 33/50 (2022.02); *C12Q 1/6806* (2022.02); *C12Q 1/6827* (2022.02); *C12Q 1/686* (2022.02)

(21)(22) Заявка: 2021137350, 16.12.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 16.12.2021

Дата регистрации:
 30.06.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 16.12.2021

(45) Опубликовано: 30.06.2022 Бюл. № 19

Адрес для переписки:

308015, Белгородская обл., г. Белгород, ул.
 Победы, 85, НИУ "БелГУ", ОИС, Крыловой
 А.С.

(72) Автор(ы):

Решетников Евгений Александрович (RU),
 Чурносов Михаил Иванович (RU),
 Елыкова Анна Владимировна (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 2738680 C1, 15.12.2020. RU
 2540928 C1, 10.02.2015. RU 2738674 C1,
 15.12.2020. MARK P.J. et al. Kiss1 and Kiss1r
 mRNA expression in the rat placenta: changes
 with gestational age and regulation by
 glucocorticoids. *Placenta*. 2013 Aug; 34(8): 657-62.
 PONOMARENKO I. et al. Candidate genes for
 age at menarche are associated with endometrial
 (см. прод.)

(54) Способ прогнозирования риска развития задержки роста плода с учетом эпистатических взаимодействий полиморфных локусов менархе

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины. Предложен способ прогнозирования риска развития задержки роста плода (ЗРП) у неродственных русских индивидуумов, уроженок Центрально-Черноземного региона РФ и проживающих в Белгородской области. Осуществляют выделение ДНК из периферической венозной крови. Проводят анализ генетических маркеров rs7538038 KISS1 и rs999460 NKX2-1. Повышенный риск развития

ЗРП прогнозирует модель эпистатических взаимодействий полиморфных локусов менархе, включающая генотипы rs7538038 AA KISS1 и rs999460 AA NKX2-1. Изобретение обеспечивает получение критериев оценки риска развития ЗРП у беременных русской национальности, уроженок Центрального Черноземья РФ, на основе данных о полиморфных локусах менархе rs7538038 KISS1 и rs999460 NKX2-1. 1 табл., 4 пр.

(56) (продолжение):

hyperplasia. *Gene*. 2020 Oct 5; 757: 144933.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)
C12Q 1/6827 (2018.01)
C12Q 1/686 (2018.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

G01N 33/50 (2022.02); C12Q 1/6806 (2022.02); C12Q 1/6827 (2022.02); C12Q 1/686 (2022.02)(21)(22) Application: **2021137350, 16.12.2021**(24) Effective date for property rights:
16.12.2021Registration date:
30.06.2022

Priority:

(22) Date of filing: **16.12.2021**(45) Date of publication: **30.06.2022** Bull. № 19

Mail address:

**308015, Belgorodskaya obl., g. Belgorod, ul.
Pobedy, 85, NIU "BelGU", OIS, Krylovoj A.S.**

(72) Inventor(s):

**Reshetnikov Evgenij Aleksandrovich (RU),
Churnosov Mikhail Ivanovich (RU),
Elykova Anna Vladimirovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Belgorodskij gosudarstvennyj
natsionalnyj issledovatel'skij universitet" (NIU
"BelGU") (RU)****(54) METHOD FOR PREDICTING THE RISK OF FETAL GROWTH RETARDATION, TAKING INTO ACCOUNT EPISTATIC INTERACTIONS OF POLYMORPHIC MENARCHE LOCI**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to the field of medicine. A method is proposed for predicting the risk of developing fetal growth retardation (FGR) in unrelated Russian individuals, natives of the Central Black Earth region of the Russian Federation and living in the Belgorod region. DNA is isolated from peripheral venous blood. The genetic markers rs7538038 KISS1 and rs999460 NKX2-1 are analyzed. An increased risk of developing FGR is predicted by a model of epistatic

interactions of polymorphic menarche loci, which includes the rs7538038 AA KISS1 and rs999460 AA NKX2-1 genotypes.

EFFECT: invention provides obtaining criteria for assessing the risk of developing FGR in pregnant Russians, natives of the Central Black Earth Region of the Russian Federation, based on data on the menarche polymorphic loci rs7538038 KISS1 and rs999460 NKX2-1.

1 cl, 1 tbl, 4 ex

Изобретение относится к области медицинской диагностики и предназначено для прогнозирования риска развития задержки роста плода.

Плацентарная недостаточность с задержкой роста плода является гетерогенным нарушением беременности и включают широкий спектр факторов риска. Основными факторами риска развития ЗРП являются: материнские факторы (возраст, вес, курение, паритет, артериальная гипертензия в предыдущую беременность, семейная история ЗРП, ЗРП и/или преэклампсия в предыдущую беременность, внутриутробная гибель плода, унаследованная или приобретенная тромбофилия, анемия, аутоиммунные заболевания, сахарный диабет, пороки развития матки); плодовые факторы (многоплодная беременность, врожденные инфекции, анеуплоидии, генетические синдромы).

Значительно повышают риск развития плацентарной недостаточности и ЗРП: возраст матери больше 35 лет, курение и употребление алкоголя во время беременности, низкий материнский рост, низкий показатель массы тела до беременности и низкий прирост массы во время беременности, плохое питание матери, низкий социально-экономический статус, инфекции матери, плаценты и плода (Different risk factors for very low birth weight, term-small-for-gestational-age, or preterm birth in Japan / N. Tamura, T. Hanaoka, K. Ito [et al.]. – DOI: 10.3390/ijerph15020369 // Int. J. Environ. Res. Public. Health. – 2018. – Vol. 15, № 2. – Art. 369. – URL: <https://www.mdpi.com/1660-4601/15/2/369>).

Наличие соматической патологии и отягощенный акушерско-гинекологический анамнез значительно повышают риск возникновения плацентарной недостаточности и развитие ЗРП при последующих беременностях (Risk of stillbirth, preterm delivery, and fetal growth restriction following exposure in a previous birth: systematic review and meta-analysis / E. Malacova, A. Regan, N. Nassar [et al.] // BJOG. – 2018. – Vol. 125, № 2. – P. 183-192).

Проведенный метаанализ показал, что наличие мертворождений в предыдущих беременностях значительно увеличивало риск рождения детей весом ниже 10-го перцентиля с учетом гестационного возраста (маленьких для своего гестационного возраста) (Risk of stillbirth, preterm delivery, and fetal growth restriction following exposure in a previous birth: systematic review and meta-analysis / E. Malacova, A. Regan, N. Nassar [et al.] // BJOG. – 2018. – Vol. 125, № 2. – P. 183-192).

Наличие ЗРП, гестационной гипертензии, преэклампсии в анамнезе также способствовало развитию ЗРП в следующую беременность (Recurrence of small-for-gestational-age pregnancy: analysis of first and subsequent singleton pregnancies in The Netherlands / B. J. Voskamp, B. M. Kazemier, A. C. Ravelli [et al.] // Am. J. Obstet. Gynecol. – 2013. – Vol. 208, № 5. – P. 374.e1-374.e6).

Наиболее частыми осложнениями беременности, связанными с метаболическими и гемодинамическими расстройствами в системе «мать-плацента-плод», являются плацентарная недостаточность и преэклампсия (ПЭ) (ACOG Practice Bulletin No. 202: gestational hypertension and preeclampsia // Obstet. Gynecol. – 2019. – Vol. 133, № 1. – Art. 1. – URL: <https://journals.lww.com/greenjournal/Fulltext/2019/01000/ACOG.49.aspx>). Одним из серьезных последствий плацентарной недостаточности является возникновение задержки роста плода (ЗРП) (Wardinger, J. E. Placental Insufficiency / J. E. Wardinger, S. Ambati // StatPearls / B. Abai, A. Abu-Ghosh, A. B. Acharya [et al.]; StatPearls Publishing, LLC. – Treasure Island (FL), 2021. – URL: <https://www.statpearls.com/ArticleLibrary/viewarticle/27266>). ПЭ занимает одно из ведущих мест в структуре перинатальной заболеваемости и смертности (Early-onset fetal growth restriction: a systematic review on mortality and morbidity / A. Pels, I. M. Beune, A. G. van Wassenaer-Leemhuis [et al.] // Acta Obstet. Gynecol. Scand. – 2020. – Vol. 99, № 2. – P. 153-166.), а также обуславливает в дальнейшем у детей отставание в

физическом развитии, его дисгармоничность, задержку темпов психомоторного развития (Ярыгина, Т. А. Задержка (замедление) роста плода: все, что необходимо знать практикующему врачу / Т. А. Ярыгина, А. И. Гус // *Акушерство и гинекология*. – 2020. – № 12. – С. 14-24.). На территории РФ в настоящее время данная патология встречается в 5-18% случаев (Darendeliler, F. IUGR: genetic influences, metabolic problems, environmental associations/triggers, current and future management / F. Darendeliler // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2019. – Vol. 33, № 3. – Art. 101260. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1521690X1930003X>).

Преэклампсия и задержка роста плода являются коморбидными осложнениями беременности, так как их развитие связано с аномальной плацентацией, развитием окислительного стресса, воспалительного процесса и формированием эндотелиальной дисфункции (Диагностическая значимость определения уровня внеклеточной фетальной ДНК у беременных с преэклампсией и задержкой роста плода / А. А. Садекова, З. В. Хачатрян, А. М. Красный [и др.] // *Акушерство и гинекология*. – 2019. – № 8. – С. 144-149.). Считается, что ранняя форма ЗРП регистрируется в 20-30% случаев и в том числе в 50% она связана с ранней ПЭ, тяжелой плацентарной недостаточностью и хронической гипоксией плода. На долю поздней формы приходится 70-80% всех случаев ЗРП и она значительно реже (лишь в 10% случаев) сочетается с ПЭ (Maršál, K. Preeclampsia and intrauterine growth restriction: placental disorders still not fully understood / K. Maršál // *J. Perinat. Med.* – 2017. – Vol. 45, № 7. – P. 775-777).

Низкий вес до беременности и низкий прирост веса во время беременности также приводят к увеличению риска развития ЗРП (The effect of pre-pregnancy weight and the increase of gestational weight on fetal growth restriction: a cohort study / M. Y. Shi, Y. F. Wang, K. Huang [et al.] // *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*. – 2017. – Vol. 51, № 12. – P. 1074-1078.).

Результаты многочисленных исследований указывают на мультифакторность в происхождении ПЭ и ЗРП, со значимым вкладом наследственных факторов в их развитии (Family history of pre-eclampsia and cardiovascular disease as risk factors for pre-eclampsia: the GenPE case-control study / N. C. Serrano, D. C. Quintero-Lesmes, F. Dudbridge [et al.] // *Hypertens. Pregnancy*. – 2020. – Vol. 39, № 1. – P. 56-63.). Близнецовые исследования свидетельствуют о высоких показателях наследуемости ПЭ (50-55%).

Работы по изучению молекулярно-генетических основ ПЭ, ЗРП, веса новорожденного активно проводятся различными отечественными и зарубежными научными коллективами как на уровне полногеномных исследований (GWAS) (Genome-wide association study of offspring birth weight in 86 577 women identifies five novel loci and highlights maternal genetic effects that are independent of fetal genetics / R. N. Beaumont, N. M. Warrington, A. Cavadino [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 2018. – Vol. 27, № 4. – P. 742-756.) так и на основе изучения ассоциаций однонуклеотидного полиморфизма (SNP) генов-кандидатов с данными фенотипами (Functionally significant polymorphisms of ESR1 and PGR and risk of intrauterine growth restriction in population of Central Russia / O. Golovchenko, M. Abramova, I. Ponomarenko [et al.] // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 2020. – Vol. 253. – P. 52-57.).

Согласно материалам некоторых исследований, одним из факторов риска развития осложнений беременности может являться возраст менархе (Age at menarche, menstrual characteristics, and risk of preeclampsia / D.F. Abetew, D.A. Enquobahrie, M. Dishy [et al.]. – DOI: 10.5402/2011/472083 // *ISRN Obstet. Gynecol.* – 2011. – Vol. 2011. – Art. 472083. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2011/472083/>). Следует отметить, что возраст появления первых месячных, характеризуя функционирование гипоталамо-гипофизарно-яичниковой системы в организме женщины (Plant, T.M. 60 years of Neuroendocrinology: the hypothalamo-pituitary-gonadal axis / T.M. Plant // *J. Endocrinol.* – 2015. – Vol. 226, № 2. –

Р. Т41-Т54.), является одним из ключевых показателей как его пубертатного этапа развития, так и важным маркером фертильности женщины и возможных проблем с ее здоровьем в дальнейшей жизни (Пономаренко И.В. Менархе как этап пубертатного развития и его генетические детерминанты / И.В. Пономаренко, М.И. Чурносков // 5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65
 70
 75
 80
 85
 90
 95
 100
 105
 110
 115
 120
 125
 130
 135
 140
 145
 150
 155
 160
 165
 170
 175
 180
 185
 190
 195
 200
 205
 210
 215
 220
 225
 230
 235
 240
 245
 250
 255
 260
 265
 270
 275
 280
 285
 290
 295
 300
 305
 310
 315
 320
 325
 330
 335
 340
 345
 350
 355
 360
 365
 370
 375
 380
 385
 390
 395
 400
 405
 410
 415
 420
 425
 430
 435
 440
 445
 450
 455
 460
 465
 470
 475
 480
 485
 490
 495
 500
 505
 510
 515
 520
 525
 530
 535
 540
 545
 550
 555
 560
 565
 570
 575
 580
 585
 590
 595
 600
 605
 610
 615
 620
 625
 630
 635
 640
 645
 650
 655
 660
 665
 670
 675
 680
 685
 690
 695
 700
 705
 710
 715
 720
 725
 730
 735
 740
 745
 750
 755
 760
 765
 770
 775
 780
 785
 790
 795
 800
 805
 810
 815
 820
 825
 830
 835
 840
 845
 850
 855
 860
 865
 870
 875
 880
 885
 890
 895
 900
 905
 910
 915
 920
 925
 930
 935
 940
 945
 950
 955
 960
 965
 970
 975
 980
 985
 990
 995
 1000
 1005
 1010
 1015
 1020
 1025
 1030
 1035
 1040
 1045
 1050
 1055
 1060
 1065
 1070
 1075
 1080
 1085
 1090
 1095
 1100
 1105
 1110
 1115
 1120
 1125
 1130
 1135
 1140
 1145
 1150
 1155
 1160
 1165
 1170
 1175
 1180
 1185
 1190
 1195
 1200
 1205
 1210
 1215
 1220
 1225
 1230
 1235
 1240
 1245
 1250
 1255
 1260
 1265
 1270
 1275
 1280
 1285
 1290
 1295
 1300
 1305
 1310
 1315
 1320
 1325
 1330
 1335
 1340
 1345
 1350
 1355
 1360
 1365
 1370
 1375
 1380
 1385
 1390
 1395
 1400
 1405
 1410
 1415
 1420
 1425
 1430
 1435
 1440
 1445
 1450
 1455
 1460
 1465
 1470
 1475
 1480
 1485
 1490
 1495
 1500
 1505
 1510
 1515
 1520
 1525
 1530
 1535
 1540
 1545
 1550
 1555
 1560
 1565
 1570
 1575
 1580
 1585
 1590
 1595
 1600
 1605
 1610
 1615
 1620
 1625
 1630
 1635
 1640
 1645
 1650
 1655
 1660
 1665
 1670
 1675
 1680
 1685
 1690
 1695
 1700
 1705
 1710
 1715
 1720
 1725
 1730
 1735
 1740
 1745
 1750
 1755
 1760
 1765
 1770
 1775
 1780
 1785
 1790
 1795
 1800
 1805
 1810
 1815
 1820
 1825
 1830
 1835
 1840
 1845
 1850
 1855
 1860
 1865
 1870
 1875
 1880
 1885
 1890
 1895
 1900
 1905
 1910
 1915
 1920
 1925
 1930
 1935
 1940
 1945
 1950
 1955
 1960
 1965
 1970
 1975
 1980
 1985
 1990
 1995
 2000
 2005
 2010
 2015
 2020
 2025
 2030
 2035
 2040
 2045
 2050
 2055
 2060
 2065
 2070
 2075
 2080
 2085
 2090
 2095
 2100
 2105
 2110
 2115
 2120
 2125
 2130
 2135
 2140
 2145
 2150
 2155
 2160
 2165
 2170
 2175
 2180
 2185
 2190
 2195
 2200
 2205
 2210
 2215
 2220
 2225
 2230
 2235
 2240
 2245
 2250
 2255
 2260
 2265
 2270
 2275
 2280
 2285
 2290
 2295
 2300
 2305
 2310
 2315
 2320
 2325
 2330
 2335
 2340
 2345
 2350
 2355
 2360
 2365
 2370
 2375
 2380
 2385
 2390
 2395
 2400
 2405
 2410
 2415
 2420
 2425
 2430
 2435
 2440
 2445
 2450
 2455
 2460
 2465
 2470
 2475
 2480
 2485
 2490
 2495
 2500
 2505
 2510
 2515
 2520
 2525
 2530
 2535
 2540
 2545
 2550
 2555
 2560
 2565
 2570
 2575
 2580
 2585
 2590
 2595
 2600
 2605
 2610
 2615
 2620
 2625
 2630
 2635
 2640
 2645
 2650
 2655
 2660
 2665
 2670
 2675
 2680
 2685
 2690
 2695
 2700
 2705
 2710
 2715
 2720
 2725
 2730
 2735
 2740
 2745
 2750
 2755
 2760
 2765
 2770
 2775
 2780
 2785
 2790
 2795
 2800
 2805
 2810
 2815
 2820
 2825
 2830
 2835
 2840
 2845
 2850
 2855
 2860
 2865
 2870
 2875
 2880
 2885
 2890
 2895
 2900
 2905
 2910
 2915
 2920
 2925
 2930
 2935
 2940
 2945
 2950
 2955
 2960
 2965
 2970
 2975
 2980
 2985
 2990
 2995
 3000
 3005
 3010
 3015
 3020
 3025
 3030
 3035
 3040
 3045
 3050
 3055
 3060
 3065
 3070
 3075
 3080
 3085
 3090
 3095
 3100
 3105
 3110
 3115
 3120
 3125
 3130
 3135
 3140
 3145
 3150
 3155
 3160
 3165
 3170
 3175
 3180
 3185
 3190
 3195
 3200
 3205
 3210
 3215
 3220
 3225
 3230
 3235
 3240
 3245
 3250
 3255
 3260
 3265
 3270
 3275
 3280
 3285
 3290
 3295
 3300
 3305
 3310
 3315
 3320
 3325
 3330
 3335
 3340
 3345
 3350
 3355
 3360
 3365
 3370
 3375
 3380
 3385
 3390
 3395
 3400
 3405
 3410
 3415
 3420
 3425
 3430
 3435
 3440
 3445
 3450
 3455
 3460
 3465
 3470
 3475
 3480
 3485
 3490
 3495
 3500
 3505
 3510
 3515
 3520
 3525
 3530
 3535
 3540
 3545
 3550
 3555
 3560
 3565
 3570
 3575
 3580
 3585
 3590
 3595
 3600
 3605
 3610
 3615
 3620
 3625
 3630
 3635
 3640
 3645
 3650
 3655
 3660
 3665
 3670
 3675
 3680
 3685
 3690
 3695
 3700
 3705
 3710
 3715
 3720
 3725
 3730
 3735
 3740
 3745
 3750
 3755
 3760
 3765
 3770
 3775
 3780
 3785
 3790
 3795
 3800
 3805
 3810
 3815
 3820
 3825
 3830
 3835
 3840
 3845
 3850
 3855
 3860
 3865
 3870
 3875
 3880
 3885
 3890
 3895
 3900
 3905
 3910
 3915
 3920
 3925
 3930
 3935
 3940
 3945
 3950
 3955
 3960
 3965
 3970
 3975
 3980
 3985
 3990
 3995
 4000
 4005
 4010
 4015
 4020
 4025
 4030
 4035
 4040
 4045
 4050
 4055
 4060
 4065
 4070
 4075
 4080
 4085
 4090
 4095
 4100
 4105
 4110
 4115
 4120
 4125
 4130
 4135
 4140
 4145
 4150
 4155
 4160
 4165
 4170
 4175
 4180
 4185
 4190
 4195
 4200
 4205
 4210
 4215
 4220
 4225
 4230
 4235
 4240
 4245
 4250
 4255
 4260
 4265
 4270
 4275
 4280
 4285
 4290
 4295
 4300
 4305
 4310
 4315
 4320
 4325
 4330
 4335
 4340
 4345
 4350
 4355
 4360
 4365
 4370
 4375
 4380
 4385
 4390
 4395
 4400
 4405
 4410
 4415
 4420
 4425
 4430
 4435
 4440
 4445
 4450
 4455
 4460
 4465
 4470
 4475
 4480
 4485
 4490
 4495
 4500
 4505
 4510
 4515
 4520
 4525
 4530
 4535
 4540
 4545
 4550
 4555
 4560
 4565
 4570
 4575
 4580
 4585
 4590
 4595
 4600
 4605
 4610
 4615
 4620
 4625
 4630
 4635
 4640
 4645
 4650
 4655
 4660
 4665
 4670
 4675
 4680
 4685
 4690
 4695
 4700
 4705
 4710
 4715
 4720
 4725
 4730
 4735
 4740
 4745
 4750
 4755
 4760
 4765
 4770
 4775
 4780
 4785
 4790
 4795
 4800
 4805
 4810
 4815
 4820
 4825
 4830
 4835
 4840
 4845
 4850
 4855
 4860
 4865
 4870
 4875
 4880
 4885
 4890
 4895
 4900
 4905
 4910
 4915
 4920
 4925
 4930
 4935
 4940
 4945
 4950
 4955
 4960
 4965
 4970
 4975
 4980
 4985
 4990
 4995
 5000
 5005
 5010
 5015
 5020
 5025
 5030
 5035
 5040
 5045
 5050
 5055
 5060
 5065
 5070
 5075
 5080
 5085
 5090
 5095
 5100
 5105
 5110
 5115
 5120
 5125
 5130
 5135
 5140
 5145
 5150
 5155
 5160
 5165
 5170
 5175
 5180
 5185
 5190
 5195
 5200
 5205
 5210
 5215
 5220
 5225
 5230
 5235
 5240
 5245
 5250
 5255
 5260
 5265
 5270
 5275
 5280
 5285
 5290
 5295
 5300
 5305
 5310
 5315
 5320
 5325
 5330
 5335
 5340
 5345
 5350
 5355
 5360
 5365
 5370
 5375
 5380
 5385
 5390
 5395
 5400
 5405
 5410
 5415
 5420
 5425
 5430
 5435
 5440
 5445
 5450
 5455
 5460
 5465
 5470
 5475
 5480
 5485
 5490
 5495
 5500
 5505
 5510
 5515
 5520
 5525
 5530
 5535
 5540
 5545
 5550
 5555
 5560
 5565
 5570
 5575
 5580
 5585
 5590
 5595
 5600
 5605
 5610
 5615
 5620
 5625
 5630
 5635
 5640
 5645
 5650
 5655
 5660
 5665
 5670
 5675
 5680
 5685
 5690
 5695
 5700
 5705
 5710
 5715
 5720
 5725
 5730
 5735
 5740
 5745
 5750
 5755
 5760
 5765
 5770
 5775
 5780
 5785
 5790
 5795
 5800
 5805
 5810
 5815
 5820
 5825
 5830
 5835
 5840
 5845
 5850
 5855
 5860
 5865
 5870
 5875
 5880
 5885
 5890
 5895
 5900
 5905
 5910
 5915
 5920
 5925
 5930
 5935
 5940
 5945
 5950
 5955
 5960
 5965
 5970
 5975
 5980
 5985
 5990
 5995
 6000
 6005
 6010
 6015
 6020
 6025
 6030
 6035
 6040
 6045
 6050
 6055
 6060
 6065
 6070
 6075
 6080
 6085
 6090
 6095
 6100
 6105
 6110
 6115
 6120
 6125
 6130
 6135
 6140
 6145
 6150
 6155
 6160
 6165
 6170
 6175
 6180
 6185
 6190
 6195
 6200
 6205
 6210
 6215
 6220
 6225
 6230
 6235
 6240
 6245
 6250
 6255
 6260
 6265
 6270
 6275
 6280
 6285
 6290
 6295
 6300
 6305
 6310
 6315
 6320
 6325
 6330
 6335
 6340
 6345
 6350
 6355
 6360
 6365
 6370
 6375
 6380
 6385
 6390
 6395
 6400
 6405
 6410
 6415
 6420
 6425
 6430
 6435
 6440
 6445
 6450
 6455
 6460
 6465
 6470
 6475
 6480
 6485
 6490
 6495
 6500
 6505
 6510
 6515
 6520
 6525
 6530
 6535
 6540
 6545
 6550
 6555
 6560
 6565
 6570
 6575
 6580
 6585
 6590
 6595
 6600
 6605
 6610
 6615
 6620
 6625
 6630
 6635
 6640
 6645
 6650
 6655
 6660
 6665
 6670
 6675
 6680
 6685
 6690
 6695
 6700
 6705
 6710
 6715
 6720
 6725
 6730
 6735
 6740
 6745
 6750
 6755
 6760
 6765
 6770
 6775
 6780
 6785
 6790
 6795
 6800
 6805
 6810
 6815
 6820
 6825
 6830
 6835
 6840
 6845
 6850
 6855
 6860
 6865
 6870
 6875
 6880
 6885
 6890
 6895
 6900
 6905
 6

направлению: способ прогнозирования риска развития задержки развития плода в зависимости от полиморфных маркеров генов менархе KISS1 и NKX2-1. Источник информации: сайт Федерального института промышленной собственности <http://fips.ru>.

5 В изученной научно-медицинской и доступной патентной литературе авторами не было обнаружено способа прогнозирования риска развития ЗРП на основе данных о полиморфных локусах генов менархе KISS1 и NKX2-1.

Известен способ прогнозирования задержки внутриутробного роста плода (патент РФ №2526178, от 20.08.2014), отличающийся тем, что с ранних сроков беременности определяют относительное содержание CD3+CD16+56+-лимфоцитов, уровень С3-

10 компонента комплемента и растворимого рецептора фактора некроза опухоли (sTNF-R) в венозной крови женщины, вычисляют прогностический индекс (PI) по формуле:

$PI = -0,8911X1 - 0,0321X2 - 2,3669X3 + 11,0779$,

где X1 - относительное содержание CD3+CD16+CD56+-лимфоцитов, %;

X2 - концентрация С3-компонента комплемента, мг/дл;

15 X3 - концентрация sTNF-R, нг/мл

и при PI менее 0 прогнозируют задержку внутриутробного роста плода во второй половине беременности, а при PI более 0 делают заключение о низком риске развития данного патологического состояния. К недостаткам данного способа можно отнести многокомпонентность, сложный расчет, затрудняющий получение заключения о

20 прогнозе, отсутствие сведений о точности и особенно специфичности способа, поскольку изменение многих иммунологических параметров, в том числе используемых CD+-лимфоцитов, имеет место и при преэклампсии, не учитываются генетические факторы.

Известен патент № 2677335 от 16.01.2019 «Способ прогнозирования риска формирования суб- и декомпенсированной плацентарной недостаточности с исходом

25 в синдром задержки роста плода на основе генетических особенностей энергетического обмена матери» по заявке № 2017138891, от 2017.11.08. Сущность способа: проводят определение наиболее информативных сочетаний патологических полиморфизмов генов энергетического обмена PPARD(-87C>T), PPARGC 1A(S482G G>A) и AMPD(Q12X G>A), а также исследование уровня липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и

30 холестерина у матери. Затем вычисляют прогностический индекс D по формуле: $D = 0,19 * X1 + 0,39 * X2 - 0,71 * X3 - 1,04 * X4 - 0,68 * X5 - 1,86$, где D - прогностический индекс, X1 - уровень холестерина в ммоль/л в крови у женщины, X2 - уровень липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) в ммоль/л в крови женщины, X3 - наличие у женщины генотипов, содержащих вариантный аллель - 87_T полиморфного ДНК-локуса PPARD(-87C>T) в

35 гомо- и гетерозиготном состоянии: если есть - 1, если нет - 0, X4 - наличие у женщины генотипов, содержащих вариантный аллель S482 A полиморфного ДНК-локуса PPARGC 1 A(S482G G>A) в гомо- и гетерозиготном состоянии: если есть - 1, если нет - 0, X5 -

наличие у женщины генотипов, содержащих вариантный аллель Q12X_A полиморфного ДНК-локуса AMPD(Q12X G>A) в гомо- и гетерозиготном состоянии: если есть - 1, если

40 нет - 0, - 1,86 - CONST. Риск развития суб- и декомпенсированной плацентарной недостаточности с исходом в синдром задержки роста, оценивается в зависимости от величины показателя D: $D < 0$ соответствует высокому риску, $D \geq 0$ - низкому. Недостатком данного способа является низкий уровень специфичности решения: изменение данных показателей может наблюдаться у женщин с ожирением, нарушением липидного обмена,

45 атеросклерозом, данный способ ограничен в применении ввиду сложности и длительности его выполнения, а также не учитываются другие генетические детерминанты.

Известен способ прогнозирования СЗРП у женщин во втором триместре

беременности, осложненной гестозом (патент № 2221253 от 10.01.2004). Для этого в периферической венозной крови определяют число тромбоцитов, активированное парциальное тромбопластиновое время, уровень фибриногена и вычисляют прогностический индекс S по формуле: $S = AK_1 + BK_2 + CK_3 + \text{const}$, где A - число

5 тромбоцитов в $10^9/\text{л}$; B - активированное парциальное тромбопластиновое время (АПТВ); C - уровень фибриногена, г/л; K1, K2, K3 - коэффициенты, равные соответственно 0,02; 0,046; -0,06; const=-4,39, и если значение индекса S менее 0, то прогнозируют угрозу СЗРП, если значение S более 0, то прогнозируют пропорциональное развития плода. Недостатками способа являются:

10 - способ отличается трудоемкостью, так как требует определения трех показателей для вычисления прогностического критерия; в изобретении не указывается точный срок беременности, в котором следует проводить исследование и срок гестации, в котором прогнозируется развитие СЗРП; сложность математической обработки результата по формуле; не учитываются генетические факторы.

15 За прототип выбран способ прогнозирования риска развития плацентарной недостаточности с синдромом задержки роста плода 2-3-ей степени у беременных (патент РФ №2540928, от 10.02.2015), включающий забор периферической венозной крови, отличающийся тем, что после выделения ДНК проводят анализ полиморфизмов генов факторов коагуляции 20210G/A FII, 1691G/A FV, 10976G/A FVII и прогнозируют 20 повышенный риск развития плацентарной недостаточности с синдромом задержки роста плода 2-3-ей степени у беременных в случае выявления аллеля 10976G FVII и генотипа 10976GG FVII, а низкий риск прогнозируют при наличии следующих комбинаций: генотипа 20210GG FII и аллеля 10976A FVII; аллелей 20210G FII, 10976A FVII с генотипом 1691GG FV; аллелей 20210G FII и 10976A FVII. Недостатком данного 25 способа является то, что в нем не учитываются другие генетические полиморфизмы.

Задачей настоящего исследования является расширение арсенала способов диагностики, а именно создание способа прогнозирования риска развития задержки роста плода на основе данных о модели эпистатических взаимодействий полиморфных локусов менархе, включающие следующие генотипы: rs7538038 AA KISS1 × rs999460 30 AA NKX2-1.

Технический результат использования изобретения – получение критериев оценки риска развития задержки роста плода у беременных русской национальности, уроженок Центрального Черноземья РФ, на основе данных о полиморфных локусах менархе rs7538038 KISS1 и rs999460 NKX2-1, включающий:

- 35
- забор периферической венозной крови;
 - выделение ДНК из периферической венозной крови;
 - анализ полиморфизмов rs7538038 KISS1 и rs999460 NKX2-1;
 - прогнозирование высокого риска развития ЗРП у беременных при выявлении модели эпистатических взаимодействий полиморфных локусов менархе, включающие 40 следующие генотипы: rs7538038 AA KISS1 × rs999460 AA NKX2-1.

Новизна и изобретательский уровень заключаются в том, что из уровня техники не известна возможность прогноза развития ЗРП у беременных на основе данных о модели эпистатических взаимодействий полиморфных локусов менархе, включающие следующие генотипы: rs7538038 AA KISS1 × rs999460 AA NKX2-1.

45 Способ осуществляют следующим образом:

Производится забор периферической венозной крови. Выделение геномной ДНК из периферической крови осуществляют методом фенольно-хлороформной экстракции (Miller, S. A. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells /

S. A. Miller, D. D. Dykes, H. F. Polesky // *Nucleic. Acids. Res.* – 1988. – Vol. 16, № 3. – P. 1215) 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 MgCl₂, 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 -20⁰C.

Генотипирование образцов ДНК было выполнено в Центре коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского национального исследовательского медицинского центра РАН на базе НИИ медицинской генетики (использовался метод MALDI и масс-спектрометр MassARRAY Analyzer 4 (фирма производитель “Sequenom”, страна производства США). Для генотипирования использовали образцы ДНК в концентрации 10-20 нг в микролитре общим объемом 10 мкл. В процессе экспериментального анализа образцов выполняли следующие этапы: проведение мультиплексной ПЦР; осуществление SAP-реакции; выполнение iPLEX реакции с последующим обессоливанием и нанесением на SpectroCHIP; процедуры ионизации и анализа спектров с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF (Степанов, В. А. Мультиплексное генотипирование однонуклеотидных полиморфных маркеров методом масс-спектрометрии MALDI-TOF: частоты 56 SNP в генах иммунного ответа в популяциях человека / В. А. Степанов, Е. А. Трифонова // *Молекулярная биология.* – 2013. – Т. 47, № 6. – С. 976-986).

Для изучения SNP×SNP взаимодействий, ассоциированных с развитием осложнений беременности и веса новорожденного, использовалась модификация метода Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) – MB-MDR (Mbmdr: an R package for exploring gene-gene interactions associated with binary or quantitative traits / M. L. Calle, V. Urrea, N. Malats, K. van Steen // *Bioinformatics.* – 2010. – Vol. 26, № 17. – P. 2198-2199.). Для кодирования генотипов SNPs применялась кодоминантная схема (Lower-order effects adjustment in quantitative traits model-based multifactor dimensionality reduction / J. J. Mahachie, T. Cattaert, F. Van Lishout [et al.]. – DOI: 10.1371/journal.pone.0029594 // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 1. – Art. e29594. – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0029594>). В работе рассматривались наиболее значимые (имеют максимальные статистики Вальда) модели SNP×SNP взаимодействий (в среднем по 2-3 модели 2-х, 3-х и 4-х локусных взаимодействий). Коррекция на множественные сравнения выполнялась пермутационными процедурами (проводилось не менее 1000 пермутаций). При $p_{perm} < 0,01$ результаты считались статистически значимыми. Выполнение MB-MDR и пермутационного теста проводилось в одноименной программе (версия 2.6) в среде R.

Возможность использования предложенного способа для оценки прогнозирования риска развития ЗРП у беременных подтверждает анализ результатов наблюдений 904 пациенток, из них женщины с изолированной задержкой роста плода (n=194) и беременные с сочетанием задержки роста плода с преэклампсией (n=79) и 631 женщин контрольной группы. Основные медико-биологические и клиничко-анамнестические

характеристики беременных с задержкой роста плода и женщин группы контроля отражены в таблице 1.

Таблица 1

Общая характеристика беременных с задержкой роста плода и женщин контрольной группы

Показатели	Беременные с ЗПП (n=273)	Контрольная группа (n=631)	P
Средн. возраст, лет	27,18±4,84 (16-45)	26,57±4,94 (18-41)	0,017
Средн. рост, м	1,65±0,06	1,65±0,06 (1,47-1,99)	0,52
Средн. вес, кг	63,53±11,81	63,50±11,22 (42-100)	0,78
Средн. ИМТ, кг/м ²	23,40±4,31	23,40±3,47	0,23
Доля индивид. по ИМТ, даны % (кол-во): менее 18,50 18,50-24,99 25,00-29,99 более 30	8,69 (24) 66,30 (181) 14,29 (39) 10,62 (29)	5,55 (35) 66,72 (421) 22,19 (140) 5,55 (35)	0,0001
Характер-ки менархе и менструального цикла			
Средний возр. менархе, лет	12,80±1,14	12,83±1,17	0,51
Доля индивид. по возр. менархе, даны % (кол-во): менее 12 лет 12-14 лет более 14 лет	3,66 (10) 90,11 (246) 6,23 (17)	6,5 (41) 86,69 (547) 6,81 (43)	0,23
Длитель. менструальн. цикла, дни	28,11±1,64	28,05±1,93	0,19
Продолжител. менструации, дни	5,02±0,85	5,04±1,03	0,93
Репродуктив. характер-ки			
Доля женщин с 1-ой беремен.	34,93 (95)	40,41 (255)	0,19
Кол-во беремен.	1,47±1,55	1,07±2,04	0,004
Кол-во родов	0,59±0,69	0,56±0,81	0,43
Кол-во мертворожд.	0,01±0,10	0,007±0,08	0,62
Кол-во спонтанных аборт	0,23±0,53	0,13±0,35	0,07
Кол-во медицинских аборт	0,64±0,99	0,37±0,78	0,0001
Факторы риска			
Курение	61,54 (168)	63,71 (402)	0,87
Алкоголь	81,68 (223)	79,72 (503)	0,79
Артериальная гипертензия до беременности	8,79 (24)	1,74 (11)	0,0001
ЗППП в анамнезе:	35,56 (16)	26,62 (168)	0,28
Преэклампсия в анамнезе	10,99 (30)	3,80 (24)	0,001
Задержка роста плода в анамнезе	19,78 (54)	0,79 (5)	0,00001

Примечание: ЗППП – заболевания, передающиеся половым путем; p – уровень значимости различий между сравниваемыми группами по критерию Краскела-Уоллиса.

В выборку для исследования вошли женщины с преэклампсией и/или задержкой роста плода и женщины контрольной группы (с физиологическим течением беременности), давшие свое информированное согласие на участие в данной

исследовательской работе и соответствующие ряду критериев: русский этнос, место рождения и проживания – регион Центрального Черноземья России. Основаниями для исключения женщин из исследовательской выборки были отказ от участия в данной работе, наличие родства между ними различной степени, выявление тяжелых хронических заболеваний, проводящих к декомпенсации, нерусский этнос и иные (нежели Центральное Черноземье России) места рождения и/или проживания.

Клиническое, клинико-лабораторное, клинико-инструментальное обследование беременных и новорожденных детей, верификация диагноза осложнений беременности – ПЭ, ЗРП (или их отсутствие), сбор медико-биологической информации, результатов клинического, клинико-лабораторного, клинико-инструментального обследования беременных и новорожденных детей в специально разработанные анкеты и формирование электронной базы данных проводилось сертифицированными врачами профильных отделений перинатального центра Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа.

При расчете частот генотипов и анализе их ассоциаций у индивидуумов установлена значимая модель эпистатических взаимодействий полиморфных локусов менархе с формированием задержки роста плода: rs7538038 AA KISS1 × rs999460 AA NKX2-1. Комбинация генотипов, включающие следующие локусы менархе: rs7538038 AA KISS1 × rs999460 AA NKX2-1 является фактором повышенного риска развития ЗРП у женщин (beta=0,98, p=0,0004).

В качестве примеров конкретного применения разработанного способа приведено обследование русских пациенток, уроженок Центрально-Черноземного региона РФ и не являющихся родственницами между собой: проведено генетическое исследование по локусам менархе rs7538038 KISS1 и rs999460 NKX2-1.

У пациентки В., русской национальности, уроженки Центрального Черноземья, на ранних сроках беременности была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров была выявлена комбинация генотипов, включающие следующие локусы менархе: rs7538038 GG KISS1 × rs999460 AG NKX2-1, что позволило отнести ее в группу беременных с пониженным риском развития ЗРП. Это подтвердило дальнейшее наблюдение: в течение беременности и после родов не было выявлено признаков ЗРП.

У пациентки Л., при прегравидарной подготовке, была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров была определена комбинация генотипов, включающие следующие локусы менархе: rs7538038 AA KISS1 × rs999460 AA NKX2-1, что позволило отнести ее в группу беременных с повышенным риском развития ЗРП. Это подтвердило дальнейшее наблюдение. При возникновении беременности у нее на сроке 27 недель был диагностирован синдром задержки роста плода.

У пациентки Е., русской национальности, уроженки Центрального Черноземья, на ранних сроках беременности была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров была выявлена комбинация генотипов, включающие следующие локусы менархе: rs7538038 GA KISS1 × rs999460 GG NKX2-1, что позволило отнести ее в группу беременных с пониженным риском развития ЗРП. Это подтвердило дальнейшее наблюдение: в течение беременности и после родов не было выявлено признаков ЗРП.

У пациентки И., русской национальности, уроженки Центрального Черноземья, при прегравидарной подготовке была взята венозная кровь. При генотипировании ДНК-маркеров была выявлена комбинация генотипов, включающие следующие локусы менархе: rs7538038 GA KISS1 × rs999460 AG NKX2-1, что позволило отнести ее в группу беременных с пониженным риском развития ЗРП. Это подтвердило дальнейшее наблюдение: в течение беременности и после родов не было выявлено признаков ЗРП.

Применение данного способа позволит на доклиническом этапе формировать среди пациенток группы риска и своевременно реализовывать в этих группах необходимые лечебно-профилактические мероприятия по предупреждению развития ЗРП.

(57) Формула изобретения

5

Способ прогнозирования риска развития задержки роста плода (ЗРП) у
неродственных русских индивидуумов, уроженок Центрально-Черноземного региона
РФ и проживающих в Белгородской области, включающий забор периферической
венозной крови, выделение ДНК из периферической венозной крови, анализ генетических
10 маркеров rs7538038 KISS1 и rs999460 NKX2-1, отличающийся тем, что повышенный
риск развития ЗРП прогнозирует модель эпистатических взаимодействий полиморфных
локусов менархе, включающая следующие генотипы: rs7538038 AA KISS1 x rs999460
AA NKX2-1.

15

20

25

30

35

40

45