



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/48 (2018.08); G01N 33/50 (2018.08); C12Q 1/686 (2018.08)

(21)(22) Заявка: 2018108228, 07.03.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
07.03.2018Дата регистрации:
12.02.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 07.03.2018

(45) Опубликовано: 12.02.2019 Бюл. № 5

Адрес для переписки:

308015, Белгородская обл., г. Белгород, ул.
Победы, 85, НИУ "БелГУ, Петровской В.В.

(72) Автор(ы):

Чурносов Михаил Иванович (RU),
Пономаренко Ирина Васильевна (RU),
Полоников Алексей Валерьевич (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 2468367 C1, 27.11.2012. RU
2616246 C1, 13.04.2017. RU 2558854 C1,
10.08.2015. RU 2557977 C1, 27.07.2015.
MCCARTY CA et al. A novel gene-
environment interaction involved in
endometriosis. Int J Gynaecol Obstet., 2012,
116(1), p.61-63.

(54) Способ прогнозирования риска развития сочетания генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия на основе молекулярно-генетических данных

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины, а именно к диагностике и гинекологии, и предназначено для выявления риска развития сочетания генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия у женщин русской национальности, уроженок Центрального Черноземья. Для прогнозирования риска развития сочетания генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия из периферической венозной крови выделяют ДНК, затем анализируют комбинации полиморфизмов генов rs3756261, rs7753051,

rs1544410, rs2090409. При выявлении комбинации аллеля G rs3756261 с аллелем T rs7753051, с аллелем A rs1544410, с аллелем T rs2090409 прогнозируют риск развития сочетания генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия у женщин русской национальности, уроженок Центрального Черноземья. Использование изобретения обеспечивает прогнозирование риска развития сочетания генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия у женщин на доклиническом этапе. 3 пр.

RU 2 679 637 C1

RU 2 679 637 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

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

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G01N 33/48 (2018.08); G01N 33/50 (2018.08); C12Q 1/686 (2018.08)(21)(22) Application: **2018108228, 07.03.2018**(24) Effective date for property rights:
07.03.2018Registration date:
12.02.2019

Priority:

(22) Date of filing: **07.03.2018**(45) Date of publication: **12.02.2019** Bull. № 5

Mail address:

**308015, Belgorodskaya obl., g. Belgorod, ul.
Pobedy, 85, NIU "BelGU, Petrovskoj V.V.**

(72) Inventor(s):

**Churnosov Mikhail Ivanovich (RU),
Ponomarenko Irina Vasilevna (RU),
Polonikov Aleksej Valerevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Belgorodskij gosudarstvennyj
natsionalnyj issledovatel'skij universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**(54) **METHOD FOR FORECASTING THE RISK OF DEVELOPMENT OF COMBINATION OF GENITAL ENDOMETRIOSIS AND HYPERPLASTIC ENDOMETRY PROCESSES BASED ON MOLECULAR-GENETIC DATA**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to the field of medicine, namely to diagnosis and gynecology, and is intended to identify the risk of developing a combination of genital endometriosis and endometrial hyperplastic processes in women of Russian nationality, natives of the Central Black Soil Region. To predict the risk of developing a combination of genital endometriosis and endometrial hyperplastic processes, DNA is isolated from peripheral venous blood, then combinations of gene polymorphisms are analyzed rs3756261, rs7753051, rs1544410, rs2090409. When

a combination of the G rs3756261 allele with the T rs7753051 allele, with the A rs1544410 allele, and the T rs2090409 allele is detected, the risk of developing a combination of genital endometriosis and endometrial hyperplastic processes in women of Russian nationality born in the Central Black Earth Region is predicted.

EFFECT: use of the invention provides a prediction of the risk of developing a combination of genital endometriosis and endometrial hyperplastic processes in women at the preclinical stage.

1 cl, 3 ex

Изобретение относится к области медицинской диагностики, может быть использовано для прогнозирования риска развития сочетания генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия.

5 Генитальный эндометриоз – процесс, при котором за пределами полости матки происходит доброкачественное разрастание ткани, по морфологическим и функциональным свойствам подобной эндометрию [Acién P., Velasco I. Endometriosis: A Disease That Remains Enigmatic // *ISRN Obstetrics and Gynecology*. 2013. V. 2013. 242149]. Данное заболевание встречается у 10% женщин репродуктивного возраста и является одной из основных причин бесплодия, дисменореи, диспареунии, а также хронических тазовых болей, спаечного процесса органов малого таза, что в совокупности приводит к общему ухудшению качества жизни женщин [Mehedintu C., Plotogea M., Ionescu S., Antonovici M. Endometriosis still a challenge // *J of Medicine and Life*. 2014. V. 7(3). P. 349-357].

15 Гиперпластические процессы эндометрия – хроническое прогрессирующее заболевание, характеризующееся нефизиологической пролиферацией железистого и стромального компонента слизистой оболочки матки [Chandra V., Kim J.J., Benbrook D.M., et al. Therapeutic options for management of endometrial hyperplasia // *J Gynecol Oncol*. 2016. V. 27(1). e8]. В структуре гинекологической заболеваемости гиперплазия эндометрия составляет от 10 до 50% [Orbo A., Arnes M., Vereide A.B., Straume B. Relapse risk of endometrial hyperplasia after treatment with the levonorgestrel impregnated intrauterine system or oral progestogens // *VJOG*. 2016. V. 123(9). P. 1512–1519]. Чаще всего гиперплазия эндометрия протекает бессимптомно, особенно в постменопаузальном периоде. Риск развития рака эндометрия у женщин предменопаузального и постменопаузального периода значительно увеличивается с возрастом [Yuk J.-S. The incidence rates of endometrial hyperplasia and endometrial cancer: a four-year population-based study // *Peer J*. 2016. 4. e2374].

Сочетанное развитие генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия характеризуется более тяжелым клиническим течением и создает трудности при проведении дифференциального диагноза и выборе адекватного метода лечения.

30 С практической точки зрения представляется крайне необходимым выделение критериев индивидуального прогнозирования у женщин риска развития сочетания генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия на основании исследования генов-кандидатов с целью выявления индивидуумов, предрасположенных к формированию генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия.

35 В изученной научно-медицинской и доступной патентной литературе авторами не было обнаружено способа прогнозирования риска развития сочетания генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия на основе данных о комбинации генетических вариантов локусов rs4633, rs757647 и rs555621.

40 Для оценки сложившейся патентной ситуации был выполнен поиск по охраняемым документам за период с 1990 по 2017 гг. Анализ документов производился по направлению: способ прогнозирования риска развития сочетания генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия на основе молекулярно-генетических данных в зависимости от полиморфных маркеров генов rs3756261, rs7753051, rs1544410 и rs2090409.

45 За прототип выбран патент РФ № 2468367 (дата публикации 12.08.2011) «Способ прогнозирования риска развития гиперплазии эндометрия у женщин с генитальным эндометриозом», который заключается в том, что у пациентки выделяют ДНК из периферической венозной крови, получают данные о генетическом полиморфизме

-308G/A фактора некроза опухоли α . В случае выявления аллеля -308 А больные генитальным эндометриозом имеют высокий риск развития гиперплазии эндометрия.

Недостаток метода заключается в том, что он позволяет прогнозировать риск возникновения гиперплазии эндометрия среди больных генитальным эндометриозом и не дает возможность спрогнозировать риск развития сочетания эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия среди здоровых женщин.

Задачей настоящего исследования является расширение арсенала способов диагностики, а именно создание способа прогнозирования риска развития сочетания генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия на основе данных о сочетании однонуклеотидных полиморфизмов – rs3756261, rs7753051, rs1544410 и rs2090409.

Технический результат использования изобретения – получение критериев оценки риска развития сочетания генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия у женщин русской национальности, уроженок Центрального Черноземья на основе данных о комбинации генетических вариантов локусов rs3756261, rs7753051, rs1544410 и rs2090409.

В соответствии с поставленной задачей был разработан способ прогнозирования риска развития сочетания генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия, включающий:

- выделение ДНК из периферической венозной крови;
- анализ полиморфизмов генов rs3756261, rs7753051, rs1544410 и rs2090409;
- прогнозирование повышенного риска развития сочетания генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия у женщин русской национальности, уроженок Центрального Черноземья в случае выявления комбинации аллеля G rs3756261 с аллелем T rs7753051 с аллелем A rs1544410 с аллелем T rs2090409.

Новизна и изобретательский уровень заключаются в том, что из уровня техники не известна возможность прогноза риска развития сочетания генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия по данным о комбинации генетических вариантов локусов rs3756261, rs7753051, rs1544410 и rs2090409.

Способ осуществляют следующим образом:

ДНК выделяют из образцов периферической венозной крови индивидуумов в 2 этапа. На первом этапе к 4 мл крови 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. Сформированную ДНК растворяют в бидистиллированной, деионизованной воде и хранят при -200С. Выделенную ДНК используют для проведения полимеразной цепной реакции синтеза ДНК.

Анализ всех локусов rs3756261, rs7753051, rs1544410 и rs2090409 осуществляют методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК. ПЦР проводят на аппарате IQ5 (Bio-Rad) в режиме real time с использованием ДНК-полимеразы *Thermus aquaticus*

производства фирмы «Силекс-М» и стандартных олигонуклеотидных праймеров и зондов, синтезированных фирмой «Синтол» с последующим анализом полиморфизмов методом дискриминации аллелей. Для дискриминации аллелей используют программу Bio-Rad «IQ5-Standart Edition».

5 Возможность использования предложенного способа для оценки риска развития сочетания генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия подтверждает анализ результатов наблюдений 85 женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья РФ, имеющих сочетание
10 генитального эндометриоза с гиперпластическими процессами эндометрия и 981 человек контрольной группы. Обследование пациенток проводили врачи гинекологического отделения и отделения вспомогательных репродуктивных технологий перинатального центра Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа. В контрольную группу включали женщин, не имеющих пролиферативных заболеваний органов малого таза и доброкачественных заболеваний молочных желез. Формирование
15 контрольной выборки осуществляли при профилактических осмотрах (диспансеризации). Обследование женщин проводили врачи консультативно-диагностического отделения перинатального центра Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа.

Критерии включения в исследуемые выборки:

- 20 1. Женщины русской национальности, родившиеся в Центральном Черноземье России и не имеющие между собой родства;
2. Добровольное согласие пациенток на проведение исследования.
3. В группу больных включались индивидуумы только после установления диагнозов генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия,
25 подтвержденных с помощью клинических, клинико-инструментальных и клинико-лабораторных методов исследования.

Критерии исключения из исследуемых выборок:

1. Пациентки со злокачественными заболеваниями органов малого таза и молочных желез;
30 2. Женщины с нерусской национальностью, родившиеся вне Центрального Черноземья;
3. Индивидуумы, отказавшиеся от участия в исследовании.

Типирование молекулярно-генетических маркеров осуществляли в лаборатории «Молекулярной генетики человека» медицинского института Белгородского
35 государственного национального исследовательского университета.

Изучение роли комбинации генетических вариантов rs3756261, rs7753051, rs1544410 и rs2090409 в формировании сочетания генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия проводили с помощью программного обеспечения APSampler [<http://sources.redhat.com/cygwin/>], использующего метод Монте-Карло марковскими
40 цепями и байесовскую непараметрическую статистику [A Gibbs sampler for identification of symmetrically structured, spaced DNA motifs with improved estimation of the signal length [Text] / A. V.Favorov, M. S. Gelfand, A. V. Gerasimova [et al.] // Bioinformatics. – 2005. – Vol. 21, № 10. – P. 2240-2245].

Установлены статистически достоверные различия в концентрации комбинации
45 генетических вариантов G rs3756261 с T rs7753051 с A rs1544410 и T rs2090409 между пациентками с сочетанием генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия (9,88%) и контрольной группой (3,10%). Следовательно, комбинация указанных генетических вариантов является фактором риска развития сочетания

генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия ($p=0,0003$, $OR=3,42$, $95\% CI 1,81-6,49$).

Таким образом, результаты, полученные с помощью биоинформатического анализа, свидетельствуют о значимом вкладе комбинации полиморфных вариантов генов rs3756261, rs7753051, rs1544410 и rs2090409 в формирование сочетания генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия. Фактором риска развития сочетания генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия у женщин является комбинация аллеля G rs3756261 с аллелем T rs7753051 с аллелем A rs1544410 с аллелем T rs2090409.

В качестве примеров конкретного выполнения разработанного способа приведено генетическое обследование по локусам rs3756261, rs7753051, rs1544410 и rs2090409 трех женщин (добровольцев) русской национальности, являющихся жителями Центрального Черноземья, не имеющих среди родственников 1-й степени родства больных доброкачественными пролиферативными заболеваниями матки.

Пример 1. У женщины А. была выявлена комбинация аллеля G rs3756261 с аллелем T rs7753051 с аллелем A rs1544410 с аллелем T rs2090409. На основании этого женщина включена в группу риска по развитию сочетания генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия. Повторное обследование через 1 год подтвердило обоснованность прогноза. Назначен комплекс лечебных мероприятий, регулярный профилактический осмотр (посещение гинеколога раз в 6 месяцев).

Пример 2. У женщины В. была выявлена комбинация аллеля G rs3756261 с аллелем T rs7753051 с аллелем A rs1544410 с аллелем T rs2090409. На основании этого у нее прогнозируют повышенный риск развития сочетания генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия. Данная женщина включена в группу риска по развитию сочетания генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия, ей назначен комплекс профилактических мероприятий по предупреждению развития генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия (лечение хронических гинекологических заболеваний, рациональное питание, физическая активность, нормализация психо-эмоционального состояния, регулярный профилактический осмотр (посещение гинеколога раз в 6 месяцев и УЗИ органов малого таза) и др.). Повторные осмотры подтвердили эффективность проведенного комплекса профилактических мероприятий.

Пример 3. У женщины С. была выявлена комбинация аллеля A rs3756261 с аллелем C rs7753051 с аллелем G rs1544410 с аллелем G rs2090409. На основании этих результатов у данной пациентки прогнозируют низкий риск развития сочетания генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия, что подтверждено дальнейшим наблюдением.

Применение данного способа позволит формировать среди женщин на доклиническом этапе группы риска по развитию сочетания генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия и своевременно реализовывать в этих группах необходимые лечебно-профилактические мероприятия по предупреждению развития генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия.

(57) Формула изобретения

Способ прогнозирования риска развития сочетания генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия, включающий выделение ДНК из периферической венозной крови методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК, анализ полиморфизмов, отличающийся тем, что анализируют полиморфизмы генов

rs3756261, rs7753051, rs1544410, rs2090409 и прогнозируют повышенный риск развития сочетания генитального эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия у женщин русской национальности, уроженок Центрального Черноземья в случае выявления комбинации аллеля G rs3756261 с аллелем T rs7753051, с аллелем A rs1544410, с аллелем T rs2090409.

10

15

20

25

30

35

40

45