



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/58 (2018.02); G01N 2800/50 (2018.02); G01N 2800/364 (2018.02); C12Q 1/6804 (2018.02); C12Q 1/6827 (2018.02); C12Q 1/6858 (2018.02); C12Q 1/686 (2018.02); C12Q 2531/113 (2018.02); C12Q 2561/113 (2018.02); C12Q 2600/118 (2018.02); C12Q 2600/156 (2018.02)

(21)(22) Заявка: 2017123069, 29.06.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
29.06.2017Дата регистрации:  
18.04.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 29.06.2017

(45) Опубликовано: 18.04.2018 Бюл. № 11

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

Чурносов Михаил Иванович (RU),  
Пономаренко Ирина Васильевна (RU),  
Алтухова Оксана Борисовна (RU),  
Новакова Ольга Николаевна (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 2558854 C1, 10.08.2015.  
DEMERATH E.W. et al. Genome-wide  
association study of age at menarche in  
African-American women. Hum Mol Genet.  
2013 Aug 15; 22(16): 3329-46. Epub 2013 Apr  
17. MONDA K.L. et al. A meta-analysis  
identifies new loci associated with body mass  
index in individuals of African ancestry. Nat  
Genet. 2013 Jun; 45(6): 1-157. Epub (см.  
прод.)

(54) Способ прогнозирования риска развития генитального эндометриоза

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и предназначено для прогнозирования риска развития генитального эндометриоза. Из периферической венозной крови выделяют ДНК. Методом полимеразной цепной реакции проводят анализ полиморфизмов генов rs713586, rs10441737, rs887912. В случае выявления у женщин русской

национальности, уроженок Центрального Черноземья сочетания аллеля T rs713586 с аллелем T rs10441737 с генотипом GG rs887912 прогнозируют повышенный риск развития генитального эндометриоза. Изобретение обеспечивает получение новых критериев оценки риска развития генитального эндометриоза. 3 пр.

(56) (продолжение):

2013 Apr 14 [Найдено 12.03.2018] [он-лайн]. Найдено из Интернет: URL:  
<https://handls.nih.gov/pubs/2013-Monda-NatGenet.pdf>.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*G01N 33/50* (2006.01)  
*C12Q 1/68* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*G01N 33/58* (2018.02); *G01N 2800/50* (2018.02); *G01N 2800/364* (2018.02); *C12Q 1/6804* (2018.02); *C12Q 1/6827* (2018.02); *C12Q 1/6858* (2018.02); *C12Q 1/686* (2018.02); *C12Q 2531/113* (2018.02); *C12Q 2561/113* (2018.02); *C12Q 2600/118* (2018.02); *C12Q 2600/156* (2018.02)

(21)(22) Application: **2017123069, 29.06.2017**

(24) Effective date for property rights:  
**29.06.2017**

Registration date:  
**18.04.2018**

Priority:

(22) Date of filing: **29.06.2017**

(45) Date of publication: **18.04.2018** Bull. № 11

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

(72) Inventor(s):

**Polonikov Aleksej Valerevich (RU),  
Novakova Olga Nikolaevna (RU),  
Altukhova Oksana Borisovna (RU),  
Ponomarenko Irina Vasilevna (RU),  
Churnosov Mikhail Ivanovich (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 RISK OF GENITAL ENDOMETRIOSIS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine and aims at prediction of the risk genital endometriosis. DNA is recovered from peripheral venous blood. Polymerase chain reaction is used to analyze gene polymorphisms rs713586, rs10441737, rs887912. In case of detection in women of Russian nationality, natives of Central Chernozem region, combination of

allele T rs713586 with allele T rs10441737 with genotype GG rs887912 predict an increased risk of developing genital endometriosis.

EFFECT: invention provides obtaining new criteria for assessing risk of development of genital endometriosis.

1 cl, 3 ex

RU 2 650 994 C1

RU 2 650 994 C1

Изобретение относится к области медицинской диагностики, может быть использовано для прогнозирования риска развития генитального эндометриоза.

Эндометриоз – это гинекологическое заболевание, которое характеризуется разрастанием ткани, подобной эндометрию, по морфологическим и функциональным свойствам за пределами полости матки. Данное заболевание 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.

Генитальному эндометриозу подвержены 6-10% женщин репродуктивного возраста, однако он диагностируется у 35-50% женщин, страдающих бесплодием и у 80% женщин с выраженными тазовыми болями. Данное заболевание является показателем к гистерэктомии, а также накладывает значительные финансовые трудности на систему здравоохранения. Несмотря на то что у большинства пациенток отмечается облегчение симптомов после применения медикаментозного или малоинвазивного хирургического лечения, частота рецидивирования превышает 50% после прекращения медикаментозной терапии и спустя 5 лет после малоинвазивного хирургического вмешательства [Lindsay S.F., Luciano D.E., Luciano A.A. Emerging therapy for endometriosis // Expert Opin. Emerging Drugs. 2015. Vol. 20, №3. P. 19-28].

С практической точки зрения представляется крайне необходимым выделение критериев индивидуального прогнозирования у женщин риска развития генитального эндометриоза на основании исследования генов-кандидатов с целью выявления женщин, предрасположенных к генитальному эндометриозу.

В изученной научно-медицинской и доступной патентной литературе авторами не было обнаружено способа прогнозирования риска развития генитального эндометриоза на основе данных о сочетании генетических полиморфизмов rs713586, rs10441737, rs887912.

Для оценки сложившейся патентной ситуации был выполнен поиск по охраняемым документам за период с 1990 по 2016 гг. Анализ документов производился по направлению: способ прогнозирования риска развития генитального эндометриоза на основе молекулярно-генетических данных в зависимости от полиморфных маркеров генов rs7538038, rs1782507 и rs7589318.

В патенте РФ № 2247391 (дата публикации 27.02.2005), где предложен «Способ ранней диагностики наружного генитального эндометриоза у женщин», заключающийся в определении активности катепсина в биоптате эндометрия. При ее значении 0,1 Ед.ферм.акт/час и менее диагностируют наружный генитальный эндометриоз.

Выявлен патент РФ № 2526823 (дата публикации 27.08.2014), где предложен «Способ диагностики наружного генитального эндометриоза», включающий исследование сыворотки крови, отличающийся тем, что в сыворотке крови определяют уровень липопротеинов высокой плотности и при величине 0,77 ммоль/л и выше диагностируют наружный генитальный эндометриоз.

Общий недостаток указанных способов заключается в том, что не рассматриваются генетические полиморфизмы и их сочетания с риском развития генитального эндометриоза.

В патенте РФ № 2592240 (дата публикации 20.07.2016) «Способ диагностики ранних стадий наружного генитального эндометриоза», сущность которого заключается в определении содержания 6-сульфатоксимелатонина в утренней порции мочи женщин и при его концентрации, равной 41 нг/мл и ниже, диагностируют наружный генитальный эндометриоз I-II стадии.

Недостаток метода заключается в том, что он позволяет диагностировать наружный генитальный эндометриоз I-II стадии, но не дает возможности прогноза риска развития эндометриоза у женщин.

За аналог выбран патент РФ № 2558854 (дата публикации 10.08.2015) «Способ прогнозирования риска развития эндометриоза», который заключается в выделении ДНК из периферической венозной крови, типировании генетических полиморфизмов генов интерлейкинов и анализе сочетаний полиморфизмов гена интерлейкина 6 (-174 G/C IL-6), интерлейкина 1B (-511 C/T IL-1B), интерлейкина 10 (-592 C/A IL-10), генов хемокинов фактора стромальных клеток (-801 G/A SDF1), макрофагального воспалительного протеина -1 $\beta$  (+1931 A/T MIP 1 $\beta$ ), регулятора активности нормальной экспрессии и секреции Т-клеток (-403 G/A RANTES), интерферона индуцибельного хемоаттрактанта Т-клеток (A/G I-TAC). Повышенный риск развития изолированного эндометриоза прогнозируют при выявлении комбинаций сочетания аллелей -174 C IL-6, -801 A SDF1, +1931 A MIP1 $\beta$ , -592 C IL-10, аллелей -801 A SDF1, -403 G RANTES, +1931 A MIP1 $\beta$ , -592 C IL-10, аллелей -801 A SDF1, -403 G RANTES, -511 C IL-1B, -592 C IL-10, аллелей -801 A SDF1, +1931 A MIP1 $\beta$ , -592 C IL-10, аллелей -174 C IL-6, -801 A SDF1, -403 G RANTES, -592 C IL-10, аллелей -801 A SDF1, A I-TAC, -511 CC IL-1B.

Недостаток метода заключается в его дороговизне, т.к. необходимо исследовать 7 различных генов.

Задачей настоящего исследования является расширение арсенала способов диагностики, а именно создание способа прогнозирования развития генитального эндометриоза на основе данных о сочетании однонуклеотидных полиморфизмов – rs713586, rs10441737 и rs887912.

Технический результат использования изобретения – получение критериев оценки риска развития генитального эндометриоза у женщин русской национальности, уроженок Центрального Черноземья на основе данных о сочетаниях генетических вариантов локусов rs713586, rs10441737 и rs887912.

В соответствии с поставленной задачей был разработан способ прогнозирования риска развития генитального эндометриоза, включающий:

- выделение ДНК из периферической венозной крови;
- анализ полиморфизмов генов rs713586, rs10441737 и rs887912;
- прогнозирование повышенного риска развития генитального эндометриоза у женщин русской национальности, уроженок Центрального Черноземья в случае выявления сочетания аллеля Т rs713586 с аллелем Т rs10441737 с генотипом GG rs887912.

Новизна и изобретательский уровень заключаются в том, что из уровня техники не известна возможность прогноза риска развития генитального эндометриоза по данным о сочетании генетических вариантов локусов rs713586, rs10441737 и rs887912.

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 MgCl<sub>2</sub>, 10мМ трис-НСl (рН=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 (рН=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 -200°С. Выделенную ДНК

использовали для проведения полимеразной цепной реакции синтеза ДНК.

Анализ всех локусов (rs713586, rs10441737 и rs887912) осуществляют методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК. ПЦР проводилась 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 использовалась программа Bio-Rad «IQ5-Standard Edition».

Возможность использования предложенного способа для оценки риска развития генитального эндометриоза подтверждает анализ результатов наблюдений 395 женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья РФ, больных генитальным эндометриозом, и 981 человек контрольной группы. Обследование пациенток проводилось врачами гинекологического отделения и отделения вспомогательных репродуктивных технологий перинатального центра Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа. В контрольную группу включались женщины, не имеющие пролиферативных заболеваний органов малого таза и доброкачественных заболеваний молочных желез. Формирование контрольной выборки осуществлялось при профилактических осмотрах (диспансеризации). Обследование женщин проводилось врачами консультативно-диагностического отделения перинатального центра Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа.

Критерии включения в исследуемые выборки:

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 диагноза генитального эндометриоза, подтвержденного 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;
2. Женщины с нерусской национальностью, родившиеся вне Центрального Черноземья;
3. Индивидуумы, отказавшиеся от участия в исследовании..

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

Изучение роли комбинаций генетических вариантов rs713586, rs10441737 и rs887912 в формировании генитального эндометриоза проводилось с помощью программного обеспечения APSampler [<http://sources.redhat.com/cygwin/>], использующего метод Монте-Карло марковскими 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].

Выявлены различия в концентрациях комбинации генетических вариантов T rs713586 с T rs10441737 с GG rs887912 между больными с генитальным эндометриозом (51,99%) и контрольной группой (40,33%). Данное сочетание является фактором риска формирования генитального эндометриоза у женщин ( $p=0,000001$ ,  $OR=1,60$ , 95% CI 1,25-2,04).

Таким образом, результаты, полученные с помощью биоинформатического анализа, свидетельствуют о вовлеченности комбинации полиморфных вариантов генов rs713586, rs10441737 и rs887912 в формирование генитального эндометриоза. Фактором риска развития генитального эндометриоза у женщин является сочетание аллеля T rs713586 с аллелем T rs10441737 с генотипом GG rs887912.

В качестве примеров конкретного выполнения разработанного способа приведено генетическое обследование по локусам rs713586, rs10441737 и rs887912 трех женщин (добровольцев) русской национальности, являющихся жителями Центрального Черноземья, не имеющих среди родственников 1-й степени родства больных эндометриозом.

Пример 1. У женщины А. было выявлено сочетание аллеля T rs713586 с аллелем T rs10441737 с генотипом GG rs887912. На основании этого женщина включена в группу риска по развитию генитального эндометриоза. 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. было выявлено сочетание аллеля T rs713586 с аллелем T rs10441737 с генотипом GG rs887912. На основании этого женщина включена в группу риска по развитию генитального эндометриоза и ей назначен комплекс профилактических мероприятий по предупреждению развития данного заболевания (лечение хронических гинекологических заболеваний, рациональное питание, физическая активность, нормализация веса и психо-эмоционального состояния, регулярный профилактический осмотр (посещение гинеколога раз в 6 месяцев и др.). Повторные осмотры подтвердили эффективность проведенного комплекса профилактических мероприятий.

Пример 3. У женщины С. было выявлено сочетание аллеля C rs713586 с аллелем C rs10441737 с генотипом AA rs887912. На основании этих результатов у данной пациентки прогнозируют низкий риск развития генитального эндометриоза, что подтверждено дальнейшим наблюдением.

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

#### (57) Формула изобретения

Способ прогнозирования риска развития генитального эндометриоза, включающий выделение ДНК из периферической венозной крови, методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК проводят анализ полиморфизмов, отличающийся тем, что анализируют полиморфизмы генов rs713586, rs10441737, rs887912 и прогнозируют повышенный риск развития генитального эндометриоза у женщин русской национальности, уроженок Центрального Черноземья в случае выявления сочетания аллеля T rs713586 с аллелем T rs10441737 с генотипом GG rs887912.