

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2016148695, 12.12.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
12.12.2016Дата регистрации:
15.12.2017

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 12.12.2016

(45) Опубликовано: 15.12.2017 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),
Овчарова Вероника Сергеевна (RU),
Акулова Людмила Юрьевна (RU),
Зарудская Оксана Мирославовна (RU),
Добродомова Ирина Сергеевна (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 2568892 C1, 20.11.2015. RU
2012131290 A, 27.01.2014. RU 2013117668 A,
27.10.2014. RU 2568893 C1, 20.11.2015. RU
2578425 C2, 27.03.2016. RU 2545760 C2,
10.04.2015. Куликов А. В. Прогнозирование
и оценка тяжести преэклампсии и
эклампсии. Выбор тактики интенсивной
терапии. Автореф. дисс. д.м.н. Екатеринбург,
2003.

(54) Способ прогнозирования риска развития преэклампсии тяжелого течения

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицинской диагностики и касается способа прогнозирования риска развития преэклампсии тяжелого течения у женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрально-Черноземного региона России. Способ включает выделение ДНК из периферической венозной крови, анализ полиморфизма гена MMP-8 (rs1320632) в сочетании с другими предикторами развития данной патологии беременности. Прогнозируют риск развития преэклампсии тяжелого течения по уравнениям линейной дискриминантной функции и:

$$y_1 = -14,767 + 2,914x_1 + 1,439x_2 + 0,222x_3 + 14,345x_4, \quad y_2 = -2,228 + 2,305x_1 - 0,718x_2 + 1,888x_3 - 0,254x_4,$$

где x_1 –

генетический вариант по локусу MMP-8 (rs1320632) (AA - 1; AG или GG - 0), x_2 - наличие преэклампсии у родственников (1 - да; 0 - нет), x_3 – наличие заболеваний, передающихся половым путем (1 - да; 0 - нет), x_4 - наличие гинекологических патологий в анамнезе (1 - да; 0 - нет), в случае, если значение y_1 больше y_2 . Использование способа позволяет сформировать группы риска развития преэклампсии тяжелого течения при планировании беременности, что будет способствовать более эффективному осуществлению лечебно-профилактических мероприятий по предупреждению данной патологии беременности. 3 пр., 2 ил.

RU 2 638 785 C1

RU 2 638 785 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2016148695, 12.12.2016**(24) Effective date for property rights:
12.12.2016Registration date:
15.12.2017

Priority:

(22) Date of filing: **12.12.2016**(45) Date of publication: **15.12.2017** 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),
Ovcharova Veronika Sergeevna (RU),
Akulova Lyudmila Yurevna (RU),
Zarudskaya Oksana Miroslavovna (RU),
Dobrodomova Irina Sergeevna (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 PREDICTION OF RISK OF SEVERE PREECLAMPSIA DEVELOPMENT**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: method involves isolation of DNA from peripheral venous blood, analysis of MMP-8 (rs1320632) gene polymorphism in combination with other predictors of development of this pregnancy pathology. Risk of severe preeclampsia development is predicted according to the equations of linear discriminant function: $y_1 = -14.767 + 2.914x_1 + 1.439x_2 + 0.222x_3 + 14.345x_4$, $y_2 = -2.228 + 2.305x_1 - 0.718x_2 + 1.888x_3 - 0.254x_4$, where x_1 - is genetic

version at the MMP-8 (rs1320632) locus (AA - 1; AG or GG - 0), x_2 is presence of preeclampsia in relatives (1 - yes, 0 - no), x_3 is presence of sexually transmitted diseases (1 - yes, 0 - no), x_4 is presence of gynecological pathologies in the anamnesis (1 - yes, 0 - no), in the event that the value of y_1 is greater than y_2 .

EFFECT: effective implementation of therapeutic and preventive measures to prevent pregnancy pathology.

3 ex, 2 dwg

Изобретение относится к области медицинской диагностики, может быть использовано для прогнозирования риска развития преэклампсии тяжелого течения.

Преэклампсия (далее ПЭ) - осложнение беременности, характеризующееся развитием эндотелиальной дисфункции, полиорганной недостаточностью, нарушением свертывающей и противосвертывающей систем, микроциркуляции, обменных процессов, иммунного ответа [Серов, В.Н. Клинические рекомендации. Акушерство и гинекология. - 4-е изд. / В.Н. Серов, Г.Т. Сухих. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. - 1024 с.].

В основе развития преэклампсии могут лежать следующие механизмы: торможение инвазии цитотрофобласта в спиральные артерии матки, дисфункция эндотелия, оксидантный стресс, гиперкоагуляция, нарушения микроциркуляции.

В Российской Федерации частота ПЭ варьируется по разным территориям от 17,8% до 22,2% [Радзинский, В. Е. Иммунохимическая оценка перинатального риска [Текст]. / В. Е. Радзинский, С. Г. Морозов, Л. А. Чугунова // Вестник Российского университета дружбы народов. Сер. Медицина. – 2010. – № 5. – С. 7-12]. Возникновение преэклампсии у здоровых первобеременных отмечается в 6-12% случаев, а у женщин с сопутствующей экстрагенитальной патологией – 20-40%, при этом наблюдается существенный рост тяжелых и атипичных форм преэклампсии до 24%. Ежегодно в мире погибают в среднем 50000 женщин от тяжелой формы преэклампсии, а также связанных с ней осложнений (аспирационной пневмонии, отека легких и мозга, сердечной недостаточности, инсульта, HELLP-синдрома и т.д.).

Важной задачей практического акушерства является прогнозирование риска развития ПЭ тяжелой степени на основании исследованных полиморфизмов генов матриксных металлопротеиназ и других возможных факторов риска с целью выявления женщин, предрасположенных к развитию преэклампсии тяжелого течения.

Ген MMP-8 находится на 11 хромосоме в области 11q22.2–q22.3. Был исследован полиморфизм, связанный с заменой нуклеотида А в положении G -477 (-477A>G MMP-8 (rs1320632)).

В изученной научно-медицинской и доступной патентной литературе авторами не было обнаружено способа прогнозирования риска развития преэклампсии тяжелого течения на основе данных о полиморфном маркере матриксных металлопротеиназ MMP-8 (rs1320632) в сочетании с другими предикторами развития данной патологии беременности.

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 развития преэклампсии тяжелого течения на основе молекулярно-генетических данных в зависимости от полиморфных маркеров генов матриксных металлопротеиназ.

За прототип выбран патент РФ № 2568892 по заявке РФ № 2014135186/15, 28.08.2014 «Способ прогнозирования риска развития преэклампсии тяжелого течения» (Чурносов Михаил Иванович (RU), Каганович Евгения Николаевна (RU), Добродомова Ирина Сергеевна (RU), Орлова Валентина Семеновна (RU), Полоников Алексей Валерьевич (RU), Прощаев Кирилл Иванович (RU)). Способ предназначен для прогнозирования риска возникновения преэклампсии тяжелого течения у женщин русской национальности, уроженок Центрального Черноземья. Способ включает выделение ДНК из периферической венозной крови и анализ генетических полиморфизмов -308 G/A TNF (rs1800629), +36 A/G TNFR1 (rs767455), -801 G/A SDF 1 (rs1801157), C/G MCP-1 (rs285765). Повышенный риск развития преэклампсии тяжелого течения прогнозируют при наличии сочетания генетических вариантов -801A SDF1, +36 GG TNFR1 и -308 A TNF.

Пониженный риск развития преэклампсии тяжелого течения прогнозируют при наличии сочетания генетических вариантов -801 G SDF1 и G MCP (rs285765). Использование изобретения позволяет повысить эффективность выявления тяжелого течения преэклампсии. Недостаток способа заключается в том, что анализируются только

5 определенные генетические полиморфизмы, без включения патогенетически значимых факторов развития преэклампсии тяжелой степени.

Задачей настоящего исследования является расширение арсенала способов диагностики, а именно создание способа прогнозирования риска развития преэклампсии тяжелого течения по данным о генетическом полиморфизме MMP-8 (rs1320632) в

10 сочетании с другими предикторами развития данного осложнения беременности.

Технический результат использования изобретения – получение критериев оценки риска развития преэклампсии тяжелого течения.

В соответствии с поставленной задачей был разработан способ прогнозирования преэклампсии, включающий:

- 15 - выделение ДНК из периферической венозной крови;
- анализ полиморфизмов генов MMP-8 (rs1320632);
- прогнозирование риска развития преэклампсии тяжелого течения у женщин в зависимости от выявленных генетических вариантов по локусу MMP-8 (rs1320632) в сочетании с другими предикторами развития данной патологии беременности для
- 20 отнесения в группу женщин с ПЭ тяжелого течения по уравнениям линейной дискриминантной функции (далее ЛДФ):

$$y_1 = -14,767 + 2,914x_1 + 1,439x_2 + 0,222x_3 + 14,345x_4;$$

$$y_2 = -2,228 + 2,305x_1 - 0,718x_2 + 1,888x_3 - 0,254x_4,$$

где x_1 – генетический вариант по локусу MMP-8 (rs1320632) (AA - 1; AG или GG - 0),

25 x_2 – наличие преэклампсии у родственников (1 - да; 0 - нет), x_3 – наличие заболеваний, передающихся половым путем (далее ЗППП) (1 - да; 0 - нет), x_4 – наличие гинекологических патологий в анамнезе (1 - да; 0 - нет). Прогноз риска развития данной патологии в случае, если y_1 больше y_2 .

30 Новизна и изобретательский уровень заключаются в том, что из уровня техники не известна возможность прогноза риска развития преэклампсии тяжелого течения у женщин по наличию генетического варианта локуса MMP-8 (rs1320632) в сочетании с другими предикторами развития данной патологии беременности.

Способ осуществляют следующим образом.

35 ДНК выделяют из образцов периферической венозной крови беременных в 2 этапа. На первом этапе к 4 мл крови добавляют 25 мл лизирующего буфера, содержащего 320 мМ сахарозы, 1% тритон X-100, 5 мМ MgCl₂, 10 мМ 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

40 раствора, содержащего 25 мМ ЭДТА (pH=8,0) и 75 мМ NaCl, ресуспендируют. Затем прибавляют 0,4 мл 10% SDS, 35 мкл протеиназы К (10 мг/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

45 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.

Измерение концентрации ДНК осуществляют на спектрофотометре NanoDrop 2000. Концентрацию и чистоту выделенной ДНК оценивают при измерении оптической плотности (ОП) полученного раствора. Далее готовят «рабочие» концентрации образцов ДНК (10-20 нг в мкл) путем разведения «стоковой» ДНК деионизированной водой.

5 Полученные «рабочие образцы» ДНК хранят при -80°C .

Выделенную ДНК подвергают полимеразной цепной реакции с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров. Последовательность праймеров и зондов для полиморфизма гена матриксных металлопротеиназ MMP-8 (rs1320632) были взяты из литературного источника [Association between -799 C/T single nucleotide polymorphism of the MMP-8 promoter region and thoracic aortic dissection [Text] / Y. Li, N. Li, W. Ma [et al.] // Mol. Med. Rep. – 2014. – Vol. 10, № 4. – P. 1857-1862].

Для исследования локуса MMP-8 (rs1320632) методом ПЦР готовят реакционную смесь объемом 25 мкл: 6,7 мМ трис-HCl (pH=8,8), 2,5 мМ MgCl₂, 0,1 мкг геномной ДНК, по 10 пкмоль каждого праймера, по 5 пкмоль каждого зонда, по 200 мкМ dATP, dGTP, dCTP, dTTP и 1 единицу активной Taq-полимеразы. После денатурации выполняют 40 циклов амплификации по схеме: отжиг праймеров и денатурация. Олигонуклеотидные праймеры и зонды синтезированы фирмой «Синтол».

Изобретение характеризуется:

Фиг.1. Дискриминации аллелей методом детекции TaqMan зондов по данным величин ОЕФ (относительные единицы флуоресценции) каждого зонда на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad) с детектирующей системой в режиме реального времени полиморфизма MMP-8 (rs1320632), где ● - гомозиготы AA MMP-8 (rs1320632), ■ - гомозиготы GG MMP-8 (rs1320632), ▲ - гетерозиготы AG MMP-8 (rs1320632), ◆ - отрицательный контроль.

Фиг.2. В таблице представлены показатели линейной дискриминантной функции (ЛДФ) для женщин с преэклампсией тяжелого течения и без преэклампсии с учетом предикторов развития данного осложнения беременности и генетических факторов.

Возможность использования предложенного способа для оценки риска развития преэклампсии тяжелого течения подтверждает анализ результатов обследования 1045 женщин: 468 женщин с диагнозом преэклампсия и 577 женщин с физиологическим течением беременности (контрольная группа). В исследуемые выборки включались индивидуумы русской национальности, являющиеся уроженками Центрально-Черноземного региона России и не имеющие родства между собой. Возраст в группе беременных с ПЭ варьировался от 17 до 45 лет (в среднем $27,74 \pm 5,4$ лет), а в контрольной группе - от 15 до 49 лет (в среднем $27,80 \pm 6,5$ лет) ($p > 0,05$). Таким образом, группа контроля не отличалась от основной группы по возрасту, полу, национальности и месту рождения.

Диагностику преэклампсии осуществляли сотрудники Перинатального центра областной клинической больницы Святителя Иоасафа г. Белгорода в соответствии с Международной классификацией болезней 10-го пересмотра. Степень тяжести преэклампсии оценивали по критериям Федеральных клинических рекомендаций «Гипертензивные расстройства во время беременности, в родах и послеродовом периоде. Преэклампсия. Эклампсия» [Гипертензия во время беременности. Преэклампсия. Эклампсия: клинич. протокол [Электронный ресурс]. / Науч. центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В. И. Кулакова Минздравсоцразвития России; Ин-т Здоровья семьи; Проект «Мать и Дитя»; рук. авт. кол.: Г. Т. Сухих, Н. В. Вартапетова. – Москва, 2012. – 51 с. – Режим доступа: <http://www.volgmed.ru/uploads/files/2013-4/18295>]. Типирование молекулярно-генетических маркеров осуществляли в лаборатории «Молекулярной генетики человека» медицинского факультета Белгородского

государственного национального исследовательского университета. Формирование базы данных и статистические расчеты осуществляли с использованием программы «STATISTICA 6.0». Прогнозирование риска развития ПЭ тяжелого течения осуществляли с использованием дискриминантного анализа [Реброва, О. Ю. Статистический анализ 5 медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA [Текст]. / О. Ю. Реброва. – [3-е изд.]. – Москва: Медиа Сфера, 2006. – 305 с.: ил.; Боровиков, В. П. Statistica: искусство анализа данных на компьютере [Текст]. / В. П. Боровиков. – 2-е изд. – Санкт-Петербург: Питер, 2003. – 688 с.].

На основании построенной методом дискриминантного анализа статистической 10 модели прогнозирования риска развития преэклампсии тяжелого течения с учетом патогенетически значимых признаков, характеризующих медико-биологический статус женщин до беременности, таких как возраст возникновения беременности, показатели артериального давления, наличие ЗППП, семейный анамнез и т.д., а также генетических характеристик по исследуемым локусам матриксных металлопротеиназ, была 15 разработана модель прогнозирования ПЭ тяжелого течения, которая включала четыре статистически значимых признака: наличие преэклампсии у родственников, наличие гинекологических патологий в анамнезе, наличие заболеваний, передающихся половым путем, и генетический вариант по локусу MMP-8 (rs1320632), которые при проведении 20 данного анализа получили значение критерия Уилкса 0,292 при $F(4,654)=396,10$ и $p<0,0000$. Параметры дискриминантного анализа представлены в таблице на фиг. 2.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что изучаемые группы беременных с преэклампсией тяжелого течения и без преэклампсии по набору из всех исследованных признаков показывают неслучайную межгрупповую дисперсию. Анализ показателей F-критериев и вероятности статистической ошибки 1-го рода (p) по каждому из 25 признаков указывает на то, что по исследуемым показателям $p<0,05$. Это свидетельствует о возможности их включения в дискриминантный анализ.

В группе беременных с тяжелым течением ПЭ точность распознавания равна 74,70%, а в группе женщин без ПЭ - 100,00%. В среднем данный показатель составляет 96,81%.

С целью проверки работоспособности модели в анализ нами были дополнительно 30 включены две пациентки. У 1-й пациентки, у беременной С., определены следующие показатели: генетический вариант по локусу MMP-8 (rs1320632) - AG+GG, наличие преэклампсии у родственников - да, наличие заболеваний, передающихся половым путем, – да, наличие гинекологических патологий в анамнезе – да.

Подставляя полученные значения показателей в вышеуказанные уравнения линейной 35 дискриминантной функции, получают значения y_1 и y_2 :

$$y_1 = -14,767 + 2,914*0 + 1,439*1 + 0,222*1 + 14,345*1 = 1,23;$$

$$y_2 = -2,228 + 2,305*0 - 0,718*1 + 1,888*1 - 0,254*1 = -1,31.$$

Поскольку значение y_1 больше y_2 , сделан вывод о необходимости отнесения 40 беременной С. в группу с повышенным уровнем риска развития ПЭ тяжелого течения. Дальнейшее наблюдение подтвердило правильность прогноза.

У беременной З. определены следующие показатели: генетический вариант по локусу MMP-8 (rs1320632) - AA, наличие преэклампсии у родственников - нет, наличие 45 заболеваний, передающихся половым путем, – нет, наличие гинекологических патологий в анамнезе – нет.

Подставляя полученные значения показателей в вышеуказанные уравнения линейной дискриминантной функции, получают значения y_1 и y_2 :

$$y_1 = -14,767 + 2,914*1 + 1,439*0 + 0,222*0 + 14,345*0 = -11,762;$$

$$y_2 = -2,228 + 2,305 * 1 - 0,718 * 0 + 1,888 * 0 - 0,254 * 0 = 0,077.$$

Поскольку значение y_2 больше y_1 , сделан вывод, что нет необходимости отнесения беременной З. в группу с повышенным уровнем риска развития ПЭ тяжелого течения. Дальнейшее наблюдение подтвердило правильность прогноза.

Разработанный способ прогнозирования позволит формировать группы риска по развитию преэклампсии тяжелого течения среди женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрально-Черноземного региона России, при планировании беременности и на ранних сроках беременности, что будет способствовать более эффективному осуществлению лечебно-профилактических мероприятий по предупреждению данной патологии беременности.

(57) Формула изобретения

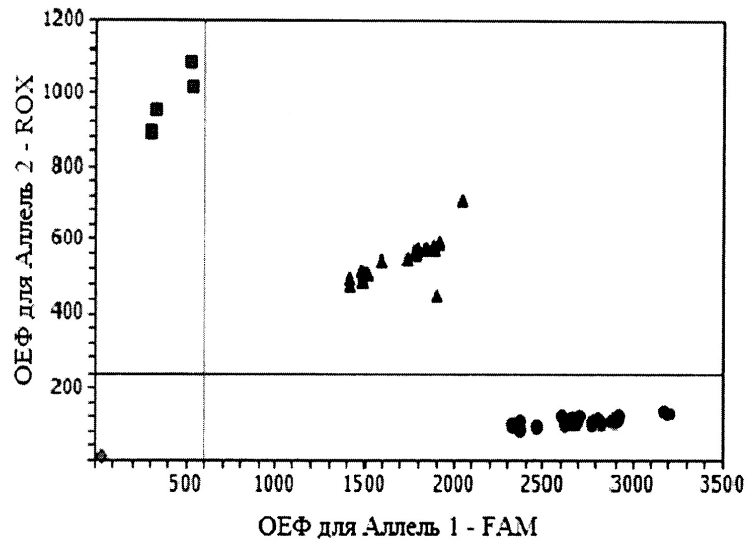
Способ прогнозирования риска возникновения преэклампсии тяжелого течения у женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрально-Черноземного региона России, включающий выделение ДНК из периферической венозной крови и анализ генетических полиморфизмов, отличающийся тем, что проводят анализ генетических вариантов по локусу MMP-8 (rs1320632), а прогноз осуществляют по уравнениям линейной дискриминантной функции:

$$y_1 = -14,767 + 2,914x_1 + 1,439x_2 + 0,222x_3 + 14,345x_4;$$

$$y_2 = -2,228 + 2,305x_1 - 0,718x_2 + 1,888x_3 - 0,254x_4,$$

где x_1 – генетический вариант по локусу MMP-8 (rs1320632) (AA - 1; AG или GG - 0), x_2 - наличие преэклампсии у родственников (1 - да; 0 - нет), x_3 – наличие заболеваний, передающихся половым путем (1 - да; 0 - нет), x_4 - наличие гинекологических патологий в анамнезе (1 - да; 0 - нет), при этом, если значение y_1 больше y_2 , прогнозируют риск развития данной патологии.

Способ прогнозирования риска развития
преэклампсии тяжелого течения



Фиг. 1

Способ прогнозирования риска развития
преэклампсии тяжелого течения

Показатели ЛДФ для женщин с преэклампсией тяжелого течения и без преэклампсии						
Признаки	Женщины с ПЭ III степени тяжести	Женщины без ПЭ	Критерий Уилкса	F-критерий	P	Толерантность (т)
Генетический вариант по локусу <i>MMP-8</i> (rs1320632) (AA-1; AG или GG -0)	2,914	2,306	0,294	4,31	0,03	0,992
Наличие преэклампсии у родственников, (да-1; нет-0)	1,492	-0,718	0,295	7,00	0,008	0,698
Наличие заболеваний передающихся половым путем, (да-1; нет-0)	0,222	1,888	0,302	22,13	0,000003	0,917
Наличие гинекологических патологий в анамнезе, (да-1; нет-0)	14,345	-0,254	0,518	505,84	0,00000	0,676
Константа	-14,767	-2,228				

Фиг.2