



(51) МПК
G01N 33/58 (2006.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)
C12Q 1/6827 (2018.01)
C12Q 1/686 (2018.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)
C12Q 1/6883 (2018.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/582 (2023.08); C12Q 1/6806 (2023.08); C12Q 1/6827 (2023.08); C12Q 1/686 (2023.08); C12Q 1/6876 (2023.08); C12Q 1/6883 (2023.08)

(21)(22) Заявка: 2023116479, 22.06.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.06.2023

Дата регистрации:
19.12.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 22.06.2023

(45) Опубликовано: 19.12.2023 Бюл. № 35

Адрес для переписки:

308015, г.Белгород, ул. Победы, 85, НИУ
"БелГУ", Шевцова Ирина Владимировна

(72) Автор(ы):

Головченко Илья Олегович (RU),
Чурносов Михаил Иванович (RU),
Елыкова Анна Владимировна (RU),
Пономаренко Ирина Васильевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет" (НИУ "БелГУ") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2650994 C1, 18.04.2018. RU
2558854 C1, 10.08.2015. RU 2676693 C1,
10.01.2019. GOLOVCHENKO I. et al. Sex
Hormone Candidate Gene Polymorphisms Are
Associated with Endometriosis. Int J Mol Sci. 2022
Nov 8; 23(22): 13691.

(54) Способ прогнозирования риска развития эндометриоза у женщин без отягощенной наследственности с использованием генетических данных

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к гинекологии и медицинской генетике, и может быть использовано для прогнозирования риска развития эндометриоза у женщин без отягощенной наследственности, русской национальности, уроженок Центрального Черноземья Российской Федерации. Из периферической венозной крови выделяют ДНК. Проводят анализ полиморфных локусов rs11031002 и rs11031005 гена FSHB и rs117145500 гена CHD9. В случае выявления комбинации

генотипов rs117145500 AA CHD9 × rs11031002 TT FSHB × rs11031005 TT FSHB прогнозируют высокий риск развития эндометриоза. Способ обеспечивает получение новых критериев оценки риска развития эндометриоза у женщин без отягощенной наследственности, русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья РФ и не имеющих родства между собой, на основе данных о комбинации генотипов генов FSHB и CHD9. 4 пр.

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19)

RU (11)

2 809 910 ⁽¹³⁾ **C1**

(51) Int. Cl.

G01N 33/58 (2006.01)

C12Q 1/6806 (2018.01)

C12Q 1/6827 (2018.01)

C12Q 1/686 (2018.01)

C12Q 1/6876 (2018.01)

C12Q 1/6883 (2018.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G01N 33/582 (2023.08); *C12Q 1/6806* (2023.08); *C12Q 1/6827* (2023.08); *C12Q 1/686* (2023.08); *C12Q 1/6876* (2023.08); *C12Q 1/6883* (2023.08)

(21)(22) Application: **2023116479, 22.06.2023**

(24) Effective date for property rights:
22.06.2023

Registration date:
19.12.2023

Priority:

(22) Date of filing: **22.06.2023**

(45) Date of publication: **19.12.2023** Bull. № 35

Mail address:

**308015, g.Belgorod, ul. Pobedy, 85, NIU "BelGU",
Shevtsova Irina Vladimirovna**

(72) Inventor(s):

**Golovchenko Ilia Olegovich (RU),
Churnosov Mikhail Ivanovich (RU),
Elykova Anna Vladimirovna (RU),
Ponomarenko Irina Vasilevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniia "Belgorodskii gosudarstvennyi
natsionalnyi issledovatel'skii universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**

(54) **METHOD OF PREDICTING RISK OF DEVELOPING ENDOMETRIOSIS IN WOMEN WITHOUT FAMILY HISTORY OF ENDOMETRIOSIS USING GENETIC DATA**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; gynecology; medical genetics.

SUBSTANCE: invention can be used to predict the risk of developing endometriosis in women without a family history of endometriosis, being of Russian nationality, natives of the Central Black Earth Region of the Russian Federation. DNA from the peripheral venous blood is isolated. The polymorphic loci rs11031002 and rs11031005 of FSHB gene and rs117145500 of CHD9 gene are analyzed. If a combination of genotypes rs117145500 AA CHD9 is detected× rs11031002 TT FSHB× rs11031005 FSHB

TTs a high risk of developing endometriosis is predicted.

EFFECT: method provides new criteria for assessing the risk of developing endometriosis in women without a family history of endometriosis, being of Russian nationality, who are natives of the Central Black Earth Region of the Russian Federation and are not related to each other, based on data on the combination of genotypes of FSHB and CHD9 genes.

1 cl, 4 ex

RU 2 809 910 C1

RU 2 809 910 C1

Изобретение относится к области медицины, а именно к диагностике и гинекологии, медицинской генетике, и может быть использовано для прогнозирования риска развития эндометриоза у женщин без отягощенной наследственности.

5 – доброкачественные пролиферативные заболевания женской репродуктивной системы – лейомиома матки, генитальный эндометриоз, гиперплазия эндометрия занимают лидирующие позиции в структуре общей гинекологической заболеваемости.

Эндометриоз является одним из наиболее распространенных заболеваний, связанных с бесплодием, поражающим 5-10% женщин репродуктивного возраста и 35-50% бесплодных женщин в целом (Bulun, S.E.; Yilmaz, B.D.; Sison, C.; Miyazaki, K.; Bernardi, 10 L.; Liu, S.; Kohlmeier, A.; Yin, P.; Milad, M.; Wei, J. Endometriosis. *Endocr. Rev.* 2019, 40, 1048–1079). Согласно данным литературы, в США общие экономические затраты на лечение женщин с эндометриозом составляют 22 млрд. долларов в год (Soliman A.M., Yang H., Du E.X., Kelley C., Winkel C. The direct and indirect costs associated with endometriosis: a systematic literature review // *Human Reproduction.* 2016. V. 31. №4. P. 712–722.).

15 Эндометриоз – процесс, при котором за пределами полости матки происходит доброкачественное разрастание ткани, по морфологическим и функциональным свойствам подобной эндометрию (Адамян Л.В., ред. Эндометриоз: диагностика, лечение и реабилитация: федеральные клинические рекомендации по ведению больных. Адамян Л.В., Андреева Е.Н., Аполихина И.А., Беженарь В.Ф., Геворкян М.А., Гус А.И. и др. 20 М.: Изд-во Научного центра). Важное значение для развития эндометриоза имеет наследственная предрасположенность (теория генетической предрасположенности) (Sourial S., Tempest N., Harangama D.K. Theories on the Pathogenesis of Endometriosis // *International Journal of Reproductive Medicine.* 2014. V. 2014: 179515). У родственников 25 первой степени родства женщин с эндометриозом риск развития данной патологии в шесть раз выше (Burney R.O., Giudice L.C. Pathogenesis and Pathophysiology of Endometriosis // *Fertility and sterility.* 2012. V. 98. №3. P. 511–519). Вклад генетических факторов в развитие эндометриоза составляет 51% (Rahmioglu N., Montgomery G.W., Zondervan K.T. Genetics of endometriosis // *Womens Health (Lond).* 2015b. V. 11. №5. P. 577–586).

30 Эндометриоз – гормонозависимое гинекологическое заболевание, связанное с выработкой половых гормонов (эстрадиол, прогестерон, фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) и др.) (Dinsdale, N.; Nepomnaschy, P.; Crespi, B. The evolutionary biology of endometriosis. *Evol. Med. Public Health* 2021, 9, 74–191). Многочисленные ассоциативные исследования, в том числе GWAS, показали связь между эндометриозом и 35 полиморфизмом генов половых гормонов (FN1, FSHB, ESR1, CCDC170, LHCGR, SYNE1 и др.).

К настоящему времени в каталоге полногеномных исследований (GWAS) National Human Genome Research Institute (<http://www.genome.gov/gwastudies/>) представлены материалы 10 работ, посвященных изучению эндометриоза. Установлено более 20 GWAS значимых полиморфных локусов, ассоциированных с эндометриозом. При этом 40 в проведенных репликативных исследованиях лишь для единичных полиморфных локусов подтверждены ассоциации с этим заболеванием.

Изучению молекулярно-генетических основ эндометриоза на основе анализа ассоциаций однонуклеотидного полиморфизма отдельных генов-кандидатов (или групп генов-кандидатов) с развитием заболевания посвящено значительное количество работ 45 как зарубежных, так и отечественных ученых. При этом следует отметить, что полученные данные неоднозначны, нередко противоречивы и имеют низкую воспроизводимость. Это определяет необходимость продолжения исследований молекулярно-генетических основ доброкачественных пролиферативных заболеваний

женской репродуктивной системы с использованием новых подходов, активно развивающихся в настоящее время системной генетики и сетевой медицины.

В Российской Федерации исследования вовлеченности полиморфизмов генов FSHB и CHD9 в формирование предрасположенности к эндометриозу у женщин без
5 отягощенной наследственности единичны и фрагментарны, а данные о роли комбинации генотипов генов FSHB и CHD9 в развитии эндометриоза отсутствуют.

Для оценки сложившейся патентной ситуации был выполнен поиск по охраняемым документам за период с 1990 по 2023 гг. Анализ документов производился по
10 направлению: способ прогнозирования риска развития эндометриоза у женщин без отягощенной наследственности в зависимости от данных о полиморфизме генов FSHB и CHD9. Источники информации: сайты Федерального института промышленной собственности <http://fips.ru>.

В изученной научно-медицинской и доступной патентной литературе авторами не было обнаружено способа прогнозирования риска развития эндометриоза у женщин
15 без отягощенной наследственности на основе данных о SNP × SNP взаимодействиях и на основе данных о комбинации генотипов генов FSHB и CHD9.

Известен способ ранней генетической диагностики риска развития генитального эндометриоза (патент RU 2676693, опубл. 10.01.2019). Способ прогнозирования риска
20 развития генитального эндометриоза для индивидуумов славянской популяции Северо-Западного федерального округа включает экстракцию ДНК из крови с последующим проведением мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, отличающийся тем, что проводят анализ полиморфных вариантов гена VEGFA: VEGFA_Forw SEQ ID N1, VEGFA_Rev SEQ ID N2, VEGFA_Wt SEQ ID N3, VEGFA_M
25 SEQ ID N4, и прогнозируют повышенный риск развития генитального эндометриоза в случае выявления аллеля С и генотипа СС полиморфизма rs833061 460 С/Т SEQ ID N5 гена VEGFA. Недостатком данного метода является низкая специфичность, так как в качестве предиктора развития генитального эндометриоза исследуется полиморфизм одного гена-регулятора ангиогенеза, носительство которого отмечается и при других пролиферативных заболеваниях.

В патенте РФ № 2592240 (опубл. 20.07.2016) описан «Способ диагностики ранних
30 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
35 диагностировать наружный генитальный эндометриоз I-II стадии, но не дает возможности прогноза риска развития эндометриоза у женщин без отягощенной наследственности, а так же, что он не учитывает роль генетических полиморфных локусов.

Известен способ прогноза риска развития наружного генитального эндометриоза
40 (заявка RU 2018 138 457, опубл. 30.04.2020). Способ предполагает расчет вероятности риска развития наружного генитального эндометриоза по формуле, которая включает оценку наличия альгодисменореи, возраста женщины, количества беременностей и возраст начала половой жизни. При вероятности, рассчитанной по формуле, больше 0,63 пациентка попадает в группу риска по развитию наружного генитального
45 эндометриоза. Недостатком метода является отсутствие учета объективных данных, а именно молекулярно-генетических предикторов развития заболевания.

Задачей настоящего исследования является расширение арсенала методов диагностики, а именно создание способа прогнозирования риска развития эндометриоза

у женщин без отягощенной наследственности на основе данных о комбинации генотипов генов FSHB и CHD9.

Технический результат использования изобретения – получение критериев оценки риска развития эндометриоза у женщин без отягощенной наследственности, у женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья РФ и не имеющих родства между собой, на основе данных о комбинации генотипов генов FSHB и CHD9, включающий:

- выделение ДНК из периферической венозной крови;
- анализ полиморфных локусов rs11031002 и rs11031005 гена FSHB и rs117145500 гена CHD9;

- прогнозирование высокого риска развития эндометриоза у женщин без отягощенной наследственности при выявлении комбинации генотипов rs117145500 AA CHD9×rs11031002 TT FSHB × rs11031005 TT FSHB.

Новизна и изобретательский уровень заключаются в том, что из уровня техники не известна возможность прогноза развития эндометриоза у женщин без отягощенной наследственности на основе данных о комбинации генотипов rs117145500 AA CHD9×rs11031002 TT FSHB × rs11031005 TT FSHB.

Способ осуществляют следующим образом:

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 -20°C.

Анализ полиморфных локусов rs11031002 и rs11031005 гена FSHB и rs117145500 гена CHD9 осуществлялся методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на термоциклере CFX-96 Real-Time System (Bio-Rad) с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров и зондов.

Генотипирование исследуемых образцов осуществлялось с использованием программного обеспечения «CFX-Manager™» методом дискриминации аллелей по величинам относительных единиц флуоресценции (ОЕФ).

Метод MDR в его модификации 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] применялся для изучения интерлокусных взаимодействий, ассоциированных с эндометриозом. Рассматривались двух-, трех-, четырех-, пяти- и шестилокусные модели. Расчеты проводили с ковариатами в программе MB-MDR (версия 2.6) в программной среде R. Наиболее значимые модели интерлокусных взаимодействий, связанных с эндометриозом, отбирались на основе

поправки Бонферрони (при этом рассматривалось число возможных комбинаций изучаемых SNPs генов FSHB и CHD9 при 2-, 3-, 4-, 5- и 6-локусных моделях). В дальнейший анализ (валидация моделей с помощью пермутационного теста) включались модели межлокусных взаимодействий, соответствующие следующим критериям: 2-х
 5 локусные модели – $p < 1,78 \cdot 10^{-3}$ ($< 0,05/28$), 3-х локусные модели – $p < 8,92 \cdot 10^{-4}$ ($< 0,05/56$), 4-х локусные модели – $p < 7,14 \cdot 10^{-4}$ ($< 0,05/70$), 5-ти локусные модели – $p < 8,92 \cdot 10^{-4}$ ($< 0,05/56$), 6-ти локусные модели – $p < 1,78 \cdot 10^{-3}$ ($< 0,05/28$). Для отобранных в соответствии с вышеуказанными критериями наиболее значимых моделей SNP×SNP взаимодействий, ассоциированных с эндометриозом у женщин без отягощенной наследственности,
 10 выполнялся пермутационный тест (проводилось 1000 пермутаций). Статистически значимым считали $p_{perm} \leq 0,001$. Отдельные комбинации генотипов, связанные с риском развития эндометриоза у женщин без отягощенной наследственности определялись методом MB-MDR при $p < 0,05$.

15 Возможность использования предложенного способа для оценки прогнозирования риска развития эндометриоза у женщин без отягощенной наследственности подтверждает анализ результатов наблюдений 1176 пациентов, из которых 295 больные генитальным эндометриозом без отягощенной наследственности (средний возраст – 39,75 лет, варьировал от 18 до 63 лет, SD=9,01) и 863 женщины контрольной группы
 20 (генитальный эндометриоз отсутствовал). Средний возраст контрольной группы составил 40,73 лет (варьировал от 18 до 68 лет, SD=8,60) и был сопоставим с возрастными характеристиками исследуемых групп больных. Изучаемые группы включали индивидуумов русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья РФ и не имеющих родства между собой. Всем больным и женщинам
 25 контрольной группы проводилось комплексное клиническое, инструментальное и лабораторное обследование, включающее общеклинические (сбор жалоб, клинический анализ крови и мочи, биохимическое исследование крови и др.) и специальные методы исследования (гинекологическое обследование, забор мазков на онкоцитологическое исследование с области стыка многослойного плоского эпителия влагалищной части
 30 шейки матки и цилиндрического эпителия цервикального канала и исследование флоры цервикального канала и влагалищного содержимого, ультразвуковое сканирование органов малого таза и др.). Все исследования проводились под контролем этического комитета медицинского факультета Белгородского государственного университета с информированного согласия пациенток на использование материалов лечебно-
 35 диагностических мероприятий, связанных с заболеванием, для научно-исследовательских целей и протоколировались по стандартам этического комитета Российской Федерации.

При изучении SNP x SNP взаимодействий установлена генетическая модель, включающая наличие значимой трехлокусной модели, вовлеченную в формирование эндометриоза у женщин без отягощенной наследственности, является rs11031002 и
 40 rs11031005 гена FSHB и rs117145500 гена CHD9 ($p_{perm} \leq 0,001$). С развитием заболевания наиболее значимая ассоциация выявлена для комбинации генотипов rs117145500 AA CHD9 x rs11031002 TT FSHB x rs11031005 TT FSHB ($\beta = 0,38$, $p = 0,002$), имеющей рисковую направленность.

45 В качестве примеров конкретного применения разработанного способа проведено генетическое обследование женщин без отягощенной наследственности русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья РФ и не имеющих родства между собой: проведено генетическое исследование по локусам rs11031002 и rs11031005 гена FSHB и rs117145500 гена CHD9.

У пациентки С. была взята венозная кровь, проведено генотипирование ДНК-маркеров, при анализе вовлеченности полиморфных локусов rs11031002 и rs11031005 гена FSHB и rs117145500 гена CHD9 была выявлена комбинация генотипов rs117145500 AA CHD9 × rs11031002 TT FSHB × rs11031005 TT FSHB, что позволило отнести пациента в группу больных с повышенным риском развития эндометриоза у женщин без отягощенной наследственности. Дальнейшее наблюдение подтвердило диагноз эндометриоз у пациентки.

У пациентки И. была взята венозная кровь, проведено генотипирование ДНК-маркеров, при анализе вовлеченности полиморфных локусов rs11031002 и rs11031005 гена FSHB и rs117145500 гена CHD9 была выявлена комбинация генотипов rs117145500 CC CHD9 × rs11031002 TT FSHB × rs11031005 CC FSHB, что позволило отнести пациентку в группу пациентов с низким риском развития эндометриоза у женщин без отягощенной наследственности. Дальнейшее наблюдение не подтвердило диагноз у пациентки.

У пациентки Л. была взята венозная кровь, проведено генотипирование ДНК-маркеров, при анализе вовлеченности полиморфных локусов rs11031002 и rs11031005 гена FSHB и rs117145500 гена CHD9 была выявлена комбинация генотипов rs117145500 CC CHD9 × rs11031002 AA FSHB × rs11031005 CC FSHB, что позволило отнести пациента в группу больных с низким риском развития эндометриоза у женщин без отягощенной наследственности. Дальнейшее наблюдение не подтвердило диагноз эндометриоз у пациентки.

У пациентки П. была взята венозная кровь, проведено генотипирование ДНК-маркеров, при анализе вовлеченности полиморфных локусов rs11031002 и rs11031005 гена FSHB и rs117145500 гена CHD9 была выявлена комбинация генотипов rs117145500 AA CHD9 × rs11031002 AA FSHB × rs11031005 TT FSHB, что позволило отнести пациентку в группу индивидумов с низким риском развития эндометриоза у женщин без отягощенной наследственности. При дальнейшем наблюдении диагноз эндометриоз у пациентки П. не подтвердился.

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

(57) Формула изобретения

Способ прогнозирования риска развития эндометриоза у женщин без отягощенной наследственности, включающий выделение ДНК из периферической венозной крови, анализ полиморфных локусов rs11031002 и rs11031005 гена FSHB и rs117145500 гена CHD9, при этом прогнозируют высокий риск развития эндометриоза у женщин без отягощенной наследственности, русской национальности, уроженок Центрального Черноземья Российской Федерации в случае выявления комбинации генотипов rs117145500 AA CHD9 × rs11031002 TT FSHB × rs11031005 TT FSHB.