



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 33/48 (2018.08)

(21)(22) Заявка: 2018109283, 15.03.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.03.2018

Дата регистрации:
22.01.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 15.03.2018

(45) Опубликовано: 22.01.2019 Бюл. № 3

Адрес для переписки:

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

(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 2557954 C1, 27.07.2015. RU
2475740 C1, 20.02.2013. Кривошей, И. В.
Ассоциации молекулярно-генетических
маркеров с формированием
гиперпластических процессов матки / И. В.
Кривошей, О. Б. Алтухова // Научные
ведомости БелГУ. Сер. Медицина.
Фармация. - 2015. - N10, вып. 30. - С. 97- 102.
I.V. PONOMARENKO ET AL. Genetic factors
of uterine (см. прод.)

(54) Способ прогнозирования риска развития сочетания миомы матки и аденомиоза с использованием генетических данных

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицинской диагностики, в частности к способу прогнозирования риска развития сочетания миомы матки и аденомиоза. Способ включает выделение ДНК из периферической венозной крови, анализ комбинации полиморфизмов генов rs2241423, rs7766109, rs4953655 и rs9939609. Фактором риска развития сочетания миомы матки и аденомиоза у женщин является комбинация генетических вариантов аллеля G

rs2241423 с аллелем G rs7766109 с аллелем A rs4953655 и генотипом TT rs9939609. Изобретение позволит формировать среди женщин на доклиническом этапе группы риска по развитию сочетания миомы матки и аденомиоза и своевременно реализовывать в этих группах необходимые лечебно-профилактические мероприятия по предупреждению развития миомы матки и аденомиоза. 3 пр.

(56) (продолжение):

hyperplastic diseases// Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 2016. vol. 7. N. 6, p. 3257-3261.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
G01N 33/48 (2018.08)

(21)(22) Application: **2018109283, 15.03.2018**

(24) Effective date for property rights:
15.03.2018

Registration date:
22.01.2019

Priority:

(22) Date of filing: **15.03.2018**

(45) Date of publication: **22.01.2019** Bull. № 3

Mail address:

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

(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 PREDICTING RISK OF DEVELOPING COMBINATION OF UTERINE FIBROIDS AND ADENOMYOSIS USING GENETIC DATA**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to the field of medical diagnostics, in particular to a method for predicting the risk of developing a combination of uterine fibroids and adenomyosis. Method includes isolation of DNA from peripheral venous blood, analysis of a combination of gene polymorphisms rs2241423, rs7766109, rs4953655 and rs9939609. Risk factor for the development of uterine fibroids and adenomyosis in women is the combination of the genetic variants of the allele G rs2241423 with the allele

G rs7766109 with the allele A rs4953655 and the genotype TT rs9939609.

EFFECT: invention will make it possible for women at the preclinical stage to form a risk group for developing a combination of uterine fibroids and adenomyosis and promptly implement in these groups the necessary therapeutic and preventive measures to prevent the development of uterine fibroids and adenomyosis.

1 cl, 3 ex

Изобретение относится к области медицинской диагностики, может быть использовано для прогнозирования риска развития сочетания миомы матки и аденомиоза.

5 Миома матки – одна из наиболее распространенных доброкачественных опухолей женской половой сферы, которая возникает у 20-40% женщин репродуктивного возраста [Taylor D.K., Holthouser K., Segars J.H., et. al. Recent scientific advances in leiomyoma (uterine fibroids) research facilitates better understanding and management // J List. 2015. V. 4. P. 183]. Клинические проявления данного заболевания связаны с маточными кровотечениями, болью, сдавливанием смежных органов, невынашиванием беременности [Commandeur 10 A.E., Styer A.K., Teixeira J.M. Epidemiological and genetic clues for molecular mechanisms involved in uterine leiomyoma development and growth // J Human Reproduction Update. 2015. V. 21(5). P. 593-615]. Как следствие, миома матки становится главной причиной гистерэктомии во многих странах мира.

15 Аденомиоз – доброкачественное заболевание матки, характеризующееся наличием гетеротопических эндометриальных желез и стромы в миометрии [Harada T., Khine Y.M., Kaponis A., et. al. The Impact of Adenomyosis on Women's Fertility // J Obstetrical & Gynecological Survey. 2016. V. 71(9). P. 557-568]. Является одной из основных причин бесплодия, меноррагии, диспареунии, а также хронических тазовых болей, что в совокупности приводит к общему ухудшению качества жизни женщин.

20 Актуальность доброкачественных пролиферативных заболеваний матки, к которым относятся миома матки, аденомиоз, связана с достаточно высокой распространенностью и коморбидностью этих патологических состояний вследствие общности этиологии и патогенеза. Поэтому они достаточно часто встречаются сочетано. Так, 80-85% женщин с аденомиозом имеют сопутствующую миому матки [Сочетанные доброкачественные 25 опухоли и гиперпластические процессы матки (миома, аденомиоз, гиперплазия эндометрия): проект клинических рекомендаций по ведению больных / Л. В. Адамян и др. – Москва: Изд-во Научного центра акушерства, гинекологии и перинатологии им. В. И. Кулакова, 2015. – 92 с]. В основе патогенетических механизмов формирования миомы матки и аденомиоза лежат молекулярно-генетические и эпигенетические 30 изменения, тесно связанные с гормональными нарушениями.

С практической точки зрения представляется крайне необходимым выделение критериев индивидуального прогнозирования у женщин риска развития сочетания миомы матки и аденомиоза на основании исследования генов-кандидатов с целью выявления индивидуумов, предрасположенных к формированию миомы матки и аденомиоза. 35

В изученной научно-медицинской и доступной патентной литературе авторами не было обнаружено способа прогнозирования риска развития сочетания миомы матки и аденомиоза на основе данных о комбинации генетических вариантов локусов rs2241423, rs7766109, rs4953655 и rs9939609.

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 миомы матки и аденомиоза на основе молекулярно-генетических данных в зависимости от полиморфных маркеров генов rs2241423, rs7766109, rs4953655 и rs9939609.

45 За прототип выбран патент РФ № 2557954 (дата публикации 27.07.2015) «Способ прогнозирования риска развития сочетанных пролиферативных заболеваний репродуктивной системы у женщин», который заключается в выделении ДНК из периферической венозной крови, проведении анализа комбинаций генетических

вариантов полиморфных маркеров генов цитокинов гена регулятора активности нормальной экспрессии и секреции Т-клеток (-403 G/A RANTES), макрофагального воспалительного протеина -1 β (+1931 A/T MIP1 β), фактора стромальных клеток (-801 G/A SDF1), интерлейкина-1 (-511 C/T IL-1B), моноцитарного хемоаттрактанта протеина -1 (C/G MCP-1), интерлейкина-4 (-590 C/T IL-4). Повышенный риск развития сочетания миомы матки с эндометриозом и гиперпластическими процессами эндометрия прогнозируют при выявлении сочетания аллелей -403 A RANTES, G MCP-1,+1931 A MIP 1 β , -590 C IL-4 или сочетания аллелей -403 A RANTES,+1931 A MIP 1 β , -801 G SDF1, -511 C IL-1B.

Недостаток метода заключается в том, что он позволяет прогнозировать риск развития сочетания миомы матки с эндометриозом и гиперпластическими процессами эндометрия, которое среди женщин встречается значительно реже по сравнению с сочетанием миомы матки и аденомиоза (внутреннего эндометриоза). Согласно данным литературы, сочетание миомы и аденомиоза наблюдается в 80-85% случаев, а сочетание миомы матки с гиперпластическими процессами эндометрия и генитальным эндометриозом регистрируются в 15-25% случаев [Сочетанные доброкачественные опухоли и гиперпластические процессы матки (миома, аденомиоз, гиперплазия эндометрия): проект клинических рекомендаций по ведению больных / Л. В. Адамян и др. – Москва: Изд-во Научного центра акушерства, гинекологии и перинатологии им. В. И. Кулакова, 2015. – 92 с].

Задачей настоящего исследования является расширение арсенала способов диагностики, а именно создание способа прогнозирования риска развития сочетания миомы матки и аденомиоза на основе данных о сочетании однонуклеотидных полиморфизмов генов rs2241423, rs7766109, rs4953655 и rs9939609.

Технический результат использования изобретения – получение критериев оценки риска развития сочетания миомы матки и аденомиоза у женщин русской национальности, уроженок Центрального Черноземья на основе данных о комбинации генетических вариантов локусов rs2241423, rs7766109, rs4953655 и rs9939609.

В соответствии с поставленной задачей был разработан способ прогнозирования риска развития сочетания миомы матки и аденомиоза, включающий:

- выделение ДНК из периферической венозной крови;
- анализ полиморфизмов генов rs2241423, rs7766109, rs4953655 и rs9939609;
- прогнозирование повышенного риска развития сочетания миомы матки и аденомиоза у женщин русской национальности, уроженок Центрального Черноземья в случае выявления комбинации генетических вариантов: аллеля G rs2241423 с аллелем G rs7766109 с аллелем A rs4953655 и генотипом TT rs9939609.

Новизна и изобретательский уровень заключаются в том, что из уровня техники не известна возможность прогноза риска развития сочетания миомы матки и аденомиоза по наличию указанной комбинации генетических вариантов локусов rs2241423, rs7766109, rs4953655 и rs9939609.

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 использовали для проведения полимеразной цепной реакции синтеза ДНК.

Анализ всех локусов rs2241423, rs7766109, rs4953655 и rs9939609 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-Standard Edition».

Возможность использования предложенного способа для оценки риска развития сочетания миомы матки и аденомиоза подтверждает анализ результатов наблюдений 109 женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья РФ, имеющих сочетание миомы матки с аденомиозом 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 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:

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 включали индивидуумов только после установления диагнозов миомы матки и аденомиоза, 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;
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 государственного национального исследовательского университета.

Изучение роли комбинации генетических вариантов rs2241423, rs7766109, rs4953655 и rs9939609 в формировании сочетания миомы матки и аденомиоза проводили с помощью программного обеспечения APSampler [<http://sources.redhat.com/cygwin/>], использующего метод Монте-Карло марковскими цепями и байесовскую непа-

раметрическую 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].

Установлено, что комбинация из четырех генетических вариантов: аллель G rs2241423 с аллелем G rs7766109 с аллелем A rs4953655 и генотипом TT rs9939609 в группе пациенток с сочетанием миомы матки и аденомиоза (30,19%) встречается чаще в 1,64 раза, чем в контрольной группе (18,43%, $p=0,004$). Следовательно, эта комбинация генетических вариантов является фактором риска развития сочетания миомы матки и аденомиоза (OR=1,91, 95% CI 1,23-2,99).

5

10 Таким образом, результаты, полученные с помощью биоинформатического анализа, свидетельствуют о значимом вкладе комбинации полиморфных вариантов генов rs2241423, rs7766109, rs4953655 и rs9939609 в формирование сочетания миомы матки и аденомиоза. Фактором риска развития сочетания миомы матки и аденомиоза у женщин является комбинация генетических вариантов аллеля G rs2241423 с аллелем G rs7766109
15 с аллелем A rs4953655 и генотипом TT rs9939609.

В качестве примеров конкретного выполнения разработанного способа приведены примеры генетического обследования по локусам rs2241423, rs7766109, rs4953655 и rs9939609 трех женщин-добровольцев русской национальности, являющихся жителями Центрального Черноземья, не имеющих среди родственников 1-й степени родства
20 больных доброкачественными пролиферативными заболеваниями матки.

Пример 1. У женщины А. была выявлена комбинация генетических вариантов аллеля G rs2241423 с аллелем G rs7766109 с аллелем A rs4953655 и генотипом TT rs9939609. На основании этого женщина включена в группу риска по развитию сочетания миомы матки и аденомиоза. Повторное обследование через 1 год подтвердило обоснованность
25 прогноза. Назначен комплекс лечебных мероприятий, регулярный профилактический осмотр (посещение гинеколога раз в 6 месяцев).

Пример 2. У женщины В. была выявлена комбинация генетических вариантов аллеля G rs2241423 с аллелем G rs7766109 с аллелем A rs4953655 и генотипом TT rs9939609. На основании этого у нее прогнозируют повышенный риск развития сочетания миомы
30 матки и аденомиоза. Данная женщина включена в группу риска по развитию сочетания миомы матки и аденомиоза, ей назначен комплекс профилактических мероприятий по предупреждению развития миомы матки и аденомиоза (лечение хронических гинекологических заболеваний, рациональное питание, физическая активность, нормализация психо-эмоционального состояния, регулярный профилактический осмотр
35 (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 генетических вариантов аллеля A rs2241423 с аллелем A rs7766109 с аллелем G rs4953655 и генотипом AA rs9939609. На основании этих результатов данную пациентку включили в группу с низким риском
40 развития сочетания миомы матки и аденомиоза, что подтверждено дальнейшим наблюдением.

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

(57) Формула изобретения

Способ прогнозирования риска развития сочетания миомы матки и аденомиоза, включающий выделение ДНК из периферической венозной крови методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК, анализ полиморфизмов генов, отличающийся тем, что анализируют полиморфизмы генов rs2241423, rs7766109, rs4953655 и rs9939609 и прогнозируют повышенный риск развития сочетания миомы матки и аденомиоза у женщин русской национальности, уроженок Центрального Черноземья в случае выявления комбинации генетических вариантов аллеля G rs2241423 с аллелем G rs7766109 с аллелем A rs4953655 и генотипом TT rs9939609.

10

15

20

25

30

35

40

45