



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/582 (2020.08); C12Q 1/6876 (2020.08); G01N 2800/50 (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2020125071, 28.07.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.07.2020Дата регистрации:
15.12.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 28.07.2020

(45) Опубликовано: 15.12.2020 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),
Головченко Олег Васильевич (RU),
Абрамова Мария Юрьевна (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 2568893 C1, 20.11.2015. RU
2642939 C1, 29.01.2018. WO 2014043763 A1,
27.03.2014.

(54) Способ прогнозирования риска развития преэклампсии у женщин без отягощенного семейного анамнеза с учетом генетических факторов

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины. Предложен способ прогнозирования риска развития преэклампсии у женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья, не имеющих отягощенного семейного анамнеза по преэклампсии, включающий выделение ДНК из периферической венозной крови и анализ полиморфизма гена рецептора прогестерона (PGR). При выявлении аллеля Т полиморфного

локуса rs1042838 гена PGR прогнозируют высокий риск развития преэклампсии. Изобретение обеспечивает получение критериев оценки риска развития преэклампсии по данным о генетическом полиморфизме rs1042838 гена PGR у женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья, не имеющих отягощенного семейного анамнеза по преэклампсии. 1 ил., 1 табл., 3 пр.

RU 2 738 675 C1

RU 2 738 675 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/6827 (2018.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G01N 33/582 (2020.08); *C12Q 1/6876* (2020.08); *G01N 2800/50* (2020.08)(21)(22) Application: **2020125071, 28.07.2020**(24) Effective date for property rights:
28.07.2020Registration date:
15.12.2020

Priority:

(22) Date of filing: **28.07.2020**(45) Date of publication: **15.12.2020 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),
Golovchenko Oleg Vasilevich (RU),
Abramova Mariya Yurevna (RU),
Ponomarenko Irina Vasilevna (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 THE RISK OF DEVELOPING PREECLAMPSIA IN WOMEN WITHOUT AN AGGRAVATED FAMILY HISTORY TAKING INTO ACCOUNT GENETIC FACTORS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine. Disclosed is a method for prediction of the risk of developing preeclampsia in females of Russian nationality, native to Central Black Earth Region, not having an aggravated family history of pre-eclampsia, involving DNA recovery from peripheral venous blood and analysis of polymorphism of the progesterone receptor gene (PGR). If observing the allele T of

polymorphous locus rs1042838 of the PGR gene, a high risk of developing preeclampsia is predicted.

EFFECT: invention provides the criteria for assessing the risk of developing preeclampsia from data on genetic polymorphism rs1042838 of the PGR gene in females of Russian nationality, which are native to the Central Black Earth Region and do not have a family history of pre-eclampsia.

1 cl, 1 dwg, 1 tbl, 3 ex

Преэклампсия (далее ПЭ) является одним из наиболее тяжелых осложнений беременности, оказывающих негативное влияние, как на состояние здоровья самой беременной, так и на состояние плода и новорожденного [Сидорова И.С., Никитина Н.А. Обоснование современной концепции развития преэклампсии // *Акушерство и гинекология*. 2019; 4: 26-33]. ПЭ встречается у 3-8% беременных и является одной из ведущих причин материнской и перинатальной заболеваемости и смертности [Than NG, Romero R, Tarca AL, et al. Integrated Systems Biology Approach Identifies Novel Maternal and Placental Pathways of Preeclampsia. *Front Immunol*. 2018;9]. Ежегодно с ПЭ связано более 60000 материнских смертей [Armaly Z, Jadaon JE, Jabbour A, Abassi ZA. Preeclampsia: Novel Mechanisms and Potential Therapeutic Approaches. *Front Physiol*. 2018; 9:973]. Следует отметить, что сроки возникновения и степень тяжести ПЭ напрямую коррелируют с состоянием новорожденных, риском неонатальных осложнений, тяжестью течения инфекционных процессов, гипоксически-ишемических состояний [Тимофеева Л.А., Караваева А.Л., Зубков В.В., Киртбая А.Р., Кан Н.Е., Тютюнник В.Л. Роль преэклампсии в исходах беременности: взгляд неонатолога // *Акушерство и гинекология*. 2019; 4: 73-8]. Нередко ПЭ сочетается с задержкой роста плода [Низяева Н.В., Амирасланов Э.Ю., Ломова Н.А., Павлович С.В., Савельева Н.А., Наговицына М.Н., Сухачёва Т.В., Серов Р.А., Щеголев А.И., Кан Н.Е. Ультраструктурные и иммуногистохимические особенности плаценты при преэклампсии в сочетании с задержкой роста плода. *Акушерство и гинекология*. 2019; 11:97-106].

Преэклампсия является многофакторным заболеванием со значимой ролью в ее формировании как генетических, так и средовых факторов [Chaiworapongsa T, Chaemsaitong P, Yeo L, Romero R. Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nat Rev Nephrol*. 2014;10(8):466–480]. К настоящему времени различными отечественными и зарубежными коллективами ученых проведены многочисленные исследования генетических и средовых факторов риска, определяющих подверженность к развитию ПЭ [Шахилова СГ, Акуленко ЛВ, и др. Генетические предикторы преэклампсии. *Проблемы репродукции*. 2017;1:110-114].

Среди факторов риска развития ПЭ важное значение имеют повышенный индекс массы тела, вредные привычки (курение), наличие хронической артериальной гипертензии и сахарного диабета, отягощенный акушерско-гинекологический анамнез (привычное невынашивание беременности, аборт) и др. [Зарипова Л.Р., Галина Т.В., Голикова Т.П., Гондаренко А.С. Прогнозирование и ранняя диагностика преэклампсии. *Вестник РУДН, серия Медицина*, 2012, № 6.С.15-22]. Влияние генетических факторов на развитие ПЭ не вызывает сомнений и составляет более 50% [Фролова Н.И., Белокрыницкая Т.Е., Колмакова К.А. Молекулярные маркеры и эпигенетические факторы риска преэклампсии в эпоху предиктивной медицины. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2019; 18(4): 95–103]. Показана значимая роль полиморфных локусов различных групп генов-кандидатов (интерлейкинов, факторов роста, сосудистых реакций, свертывания крови, фолатного цикла, детоксикации ксенобиотиков и др.) в формировании ПЭ [Reshetnikov, E.A., Akulova, et al. The insertion-deletion polymorphism of the ACE gene is associated with increased blood pressure in women at the end of pregnancy (2015) *JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 16 (3), pp. 623-632].

Известен способ прогнозирования ранней и поздней преэклампсии по патенту РФ № 2693412 (заявка № 2018140787, 20.11.2018). Способ включает забор крови и определение в крови беременных женщин концентрации фактора некроза опухоли альфа (ФНО α), фактора роста плаценты (ФРП) и плацентарного альфа-1 микроглобулина (ПАМГ), значения индекса инсулинорезистентности (НОМА-IR),

уровней инсулина и лептина в сроки 11-14 недель и 18-21 недель беременности.

Концентрации ФНО α (пкг/мл) - $44\pm 5,1$ и $91\pm 8,7$; концентрации ФРП (пкг/мл) - 84 ± 11 и 263 ± 22 ; концентрации ПАМГ (нг/мл) – $8,6\pm 2,2$ и $72,4\pm 7,6$; значенияи НОМА-IR – $1,52\pm 0,13$ и $3,64\pm 0,36$; уровня инсулина (пмоль/мл) – $59,7\pm 5,6$ и $152,3\pm 7,8$; уровня лептина (нг/мл) – $34,1\pm 3,3$ и $48,3\pm 4,4$ прогнозируют рано проявляющуюся преэклампсию; при значении этих показателей в указанные сроки беременности соответственно: концентрации ФНО α (пкг/мл) - $16\pm 2,8$ и $86\pm 7,5$; концентрации ФРП (пкг/мл) - 114 ± 12 и 272 ± 26 ; концентрации ПАМГ (нг/мл) – $7,7\pm 2,1$ и $75,6\pm 7,9$; значенияи НОМА-IR – $0,93\pm 0,08$ и $3,58\pm 0,33$; уровня инсулина (пмоль/мл) – $33,7\pm 3,4$ и $144,6\pm 7,4$; уровня лептина (нг/мл) – $20,6\pm 2,4$ и $44,5\pm 4,1$ прогнозируют поздно проявляющуюся преэклампсию. Недостатки метода заключаются в сложности проводимого анализа и его неспособности прогнозировать развитие ПЭ в период прегравидарной подготовки.

За прототип выбран патент РФ № 2 642 939 по заявке № 2016148251 от 2016.12.08 «Способ прогнозирования риска развития преэклампсии», в котором описан способ прогнозирования риска возникновения преэклампсии у женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья. Способ включает выделение геномной ДНК, проведение полимеразной цепной реакции синтеза ДНК, исследование гена и прогнозирование риска развития преэклампсии с учетом анализа полиморфизма rs1799750 MMP-1 и комплекса наиболее значимых показателей по уравнениям линейной дискриминантной функции:

$$y_1 = -61,329 + 0,434x_1 + 2,534x_2 + 3,433x_3 + 2,841x_4 + 0,874x_5 - 0,033x_6 + 2,062x_7;$$

$$y_2 = -55,473 + 0,339x_1 + 1,528x_2 - 1,679x_3 + 7,717x_4 + 0,769x_5 + 0,066x_6 + 1,666x_7,$$

где x_1 - индекс массы тела до беременности, кг/м², x_2 - наличие преэклампсии у родственников: 1 - да, 0 - нет; x_3 - наличие гинекологической патологии в анамнезе: 1 - да, 0 - нет; x_4 - наличие заболеваний, передающихся половым путем: 1 - да, 0 - нет; x_5 - САД до беременности (мм рт. ст.); x_6 - ДАД до беременности (мм рт. ст.); x_7 - генетический вариант по локусу MMP-1 (rs1799750): 1 - 1G/1G или 1G/2G; 0 - 2G/2G, при этом, если показатель y_1 больше y_2 , то прогнозируют риск развития преэклампсии. Недостатком заявленного способа является сложность расчетов и наличие большого числа вводимых данных.

Задачей настоящего исследования является расширение арсенала способов диагностики, а именно создание способа прогнозирования риска развития преэклампсии по данным о полиморфном локусе rs1042838 гена PGR.

Технический результат использования изобретения – получение критериев оценки риска развития преэклампсии по данным о генетическом полиморфизме rs1042838 гена PGR у женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья, не имеющих отягощенного семейного анамнеза по ПЭ.

Ген PGR расположен на хромосоме 11q22.1. Исследованный полиморфный локус rs1042838, расположенный в 72 позиции 4 экзона гена рецептора прогестерона (всего в гене PGR 8 экзонов) определяет несинонимичную замену аминокислоты валин на аминокислоту лейцин в 660 положении полипептида рецептора прогестерона (Val660Leu). Согласно литературным данным, аллель T локуса rs1042838 ассоциирован с идиопатическим невынашиванием беременности [Su MT, Lee IW, Chen YC, Kuo PL. Association of progesterone receptor polymorphism with idiopathic recurrent pregnancy loss in Taiwanese Han population. J Assist Reprod Genet. 2011;28(3):239–243.], развитием рака эндометрия [Lundin E, Wirgin I, Lukanova A, et al. Selected polymorphisms in sex hormone-

related genes, circulating sex hormones and risk of endometrial cancer. *Cancer Epidemiol.* 2012; 36(5):445–452], поздним менархе и более коротким менструальным циклом [Taylor KS, Small CM, Epstein MP, et al. Associations of progesterone receptor polymorphisms with age at menarche and menstrual cycle length. *Horm Res Paediatr.* 2010;74(6):421–427.]

5 В изученной научно-медицинской и доступной патентной литературе авторами не было обнаружено способа прогнозирования риска развития преэклампсии у женщин без отягощенного семейного анамнеза по ПЭ, на основе данных о полиморфном локусе rs1042838 гена PGR.

10 В соответствии с поставленной задачей был разработан способ прогнозирования возникновения преэклампсии у женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья, без отягощенного семейного анамнеза с учетом генетических факторов, включающий:

- выделение ДНК из периферической венозной крови;
- анализ полиморфизма гена рецепторов прогестерона rs1042838 PGR.
- 15 - прогнозирование высокого риска развития преэклампсии у женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья, без отягощенного семейного анамнеза при выявлении аллеля T rs1042838 PGR.

Новизна и изобретательский уровень заключаются в том, что из уровня техники не известна возможность прогноза риска развития преэклампсии у женщин без
20 отягощенного семейного анамнеза по ПЭ на основе данных о полиморфном локусе rs1042838 гена PGR.

Выделение геномной ДНК из периферической крови осуществляют методом фенольно-хлороформной экстракции (Mathew, 1984) в два этапа. На первом этапе к 4 мл крови с ЭДТА добавляют 25 мл лизирующего буфера, содержащего 320 мМ сахарозы,
25 1% тритон X-100, 5 мМ MgCl₂, 10 мМ трис-HCl с 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 с pH=8,0 и 75 мМ NaCl, ресуспендируют. Затем прибавляют 0,4 мл 10% SDS, 35 мкл протеиназы K, 10 мг/мл и инкубируют образец при
30 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
35 объемами охлажденного 96% этанола. После лиофилизации полученную ДНК растворяют в бидистиллированной, деионизованной воде и хранят при минус 20⁰С. Выделенную ДНК используют для проведения полимеразной цепной реакции синтеза ДНК.

40 Анализ полиморфизма rs1042838 гена PGR проводят методом ПЦР-синтеза ДНК на амплификаторе CFX96 с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров и зондов с последующим анализом полиморфизма методом дискриминации аллелей. Реакционная смесь объемом 25 мкл включает: 67 мМ трис-HCl с pH=8,8, 2,5 мМ MgCl₂, 0,1 мкг геномной ДНК, по 10 пМ каждого праймера, по 5 пкмоль каждого зонда, по
45 200 мкМ dATP, dGTP, dCTP, dTTP и 1 единицу активной Taq-полимеразы. После денатурации, 5 мин при 95°C, выполняют 40 циклов амплификации по схеме: отжиг праймеров – 1 мин. при t=54°C; денатурация – 15 сек. при t=95°C. При проведении ПЦР в амплификаторе CFX96 с флуоресцентной детекцией генотипирование осуществляют методом Tag Map зондов по данным величин ОЕФ (относительные единицы

флуоресценции). Для rs1042838 PGR зонд с флуоресцентным красителем ROX соответствует аллелю G, зонд с красителем FAM – аллелю T (фиг.1).

Изобретение характеризуется фигурами.

5 Фиг. 1. Дискриминации аллелей методом детекции TaqMan зондов по данным величин ОЕФ (относительные единицы флуоресценции) каждого зонда на амплификаторе CFX96 с детектирующей системой в режиме реального времени полиморфизма PGR (rs1042838):
 ● - TT, ■ - GG, ▲ - TG, ■ - отрицательный контроль.

10 Возможность использования предложенного способа для оценки риска развития преэклампсии подтверждает анализ результатов наблюдений: 190 беременных с ПЭ без отягощенного семейного анамнеза по ПЭ (средний возраст $26,88 \pm 5,37$ лет) и 324 с физиологическим течением беременности (контрольная группа, средний возраст $26,27 \pm 4,88$, $p > 0,05$). В выборки включались не родственные русские женщины, родившиеся в Центрально-Черноземном регионе РФ, не имеющие отягощенного семейного анамнеза по ПЭ. Из исследуемых выборок исключались пациентки с
 15 заболеваниями матки (фибромиома матки, аномалии развития внутренних половых органов), другой патологией беременности (аномалии прикрепления и расположения плаценты, ПН с СЗРП, резус-конфликт), патологией плода (ВПР), многоплодной беременностью.

20 Все клинические и клинико-лабораторные исследования проводили на базе Перинатального центра областной клинической больницы Святителя Иоасафа г. Белгорода в период с 2008 г. по 2015 г., с информированного согласия пациентов на использование материалов лечебно-диагностических мероприятий, проводимых за период госпитализации и после нее для научно-исследовательских целей. Диагноз преэклампсия ставился на основании наличия генерализованных отеков, артериальной
 25 гипертензии и протеинурии. Клиническое и клинико-лабораторное обследование беременных проводилось на сроке родоразрешения. Исследование проводилось под контролем этического комитета медицинского факультета НИУ БелГУ.

30 Анализ ассоциаций аллеля T гена PGR (rs1042838) с риском развития преэклампсии производился на основании полученных значений отношения шансов (OR) и их 95% доверительного интервала (95% CI) [Полиморфные локусы гена LHCGR, ассоциированные с развитием миомы матки [Текст]/ Пономаренко ИВ, Полоников АВ, Чурносов МИ// Акушерство и гинекология. 2018;10:86-91]. Коррекция на множественные сравнения проводилась с использованием адаптивного пермутационного теста (pperm). Статистически значимым считали уровень $p_{perm} < 0,05$. Расчеты выполнялись в
 35 программе PLINK v. 2.050 (<http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/>).

Установлены генотипические особенности пациенток с преэклампсией на основе данных о полиморфном локусе гена рецепторов прогестерона. С помощью логистического регрессионного анализа выявлена модель ассоциации аллеля T rs1042838 гена PGR с развитием преэклампсии согласно аддитивной ($OR = 1,43$ 95%CI 1,02-2,02, $p = 0,04$, $p_{perm} = 0,05$) и доминантной ($OR = 1,54$ 95%CI 1,05-2,27, $p = 0,03$, $p_{perm} = 0,04$) генетическим
 40 моделям взаимодействия аллелей. Наличие аллеля T полиморфного локуса rs1042838 является фактором риска развития преэклампсии ($OR = 1,42$ 95%CI 1,01-1,98, $p = 0,04$).

45 Таблица. Характеристика частот аллелей и генотипов полиморфных локусов гена PGR у беременных с преэклампсией и в контрольной группе

Локус	Аллели, генотипы	Преэклампсия (n=190) абс.(%)	Контроль (n=324) абс.(%)	OR (95%CI)	P
rs1042838	G	303 (80,59%)	547 (85,47%)	0,71 (0,49-0,99)	0,04
	T	73 (19,41%)	93 (14,53%)	1,42 (1,01-1,98)	
	G/G	120 (63,83%)	234 (73,12%)	0,65 (0,43-0,97)	0,04
	G/T	63 (33,51%)	79 (24,69%)	1,54 (1,02-2,33)	0,04
	T/T	5 (2,66%)	7 (2,19%)	1,22 (0,33-4,36)	0,97
	G/G vs. G/T vs. T/T (аддитивная модель)			1,43 (1,02-2,02)	0,04
	G/G vs. G/T + T/T (доминантная модель)			1,54 (1,05-2,27)	0,03
	G/G + G/T vs. T/T (рецессивная модель)			1,22 (0,38-3,90)	0,73

Примечание: OR – показатель отношения шансов, 95%CI – его 95% доверительный интервал, p – уровень значимости, жирным выделены значимые различия.

В качестве примеров конкретного применения разработанного способа приведено обследование женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья, не имеющих родственных связей между собой, без отягощенного семейного анамнеза по ПЭ: проведено генетическое обследование по локусу rs1042838 PGR.

У женщины К., без отягощенного семейного анамнеза по ПЭ, планирующей беременность, после забора венозной крови из локтевой вены и последующего генотипирования выявлен аллель G в генотипе GG по локусу rs1042838 PGR. По данным генотипирования пациентка К. не включается в группу индивидуумов с высоким риском развития преэклампсии. При дальнейшем наблюдении у данной женщины не было выявлено признаков преэклампсии в течение беременности.

Женщине Н., без отягощенного семейного анамнеза по ПЭ, планирующей беременность, был произведен забор венозной крови из локтевой вены с последующим генотипированием. Установлено наличие аллеля T в генотипе GT по локусу rs1042838 PGR. По данным генотипирования женщина Н. должна быть включена в группу лиц с высоким риском развития преэклампсии. При дальнейшем наблюдении у данной женщины на сроке 31 недели был установлен диагноз: умеренная преэклампсия.

У женщины Л., без отягощенного семейного анамнеза, планирующей беременность, после забора венозной крови из локтевой вены с последующим генотипированием выявлено наличие аллеля T в генотипе TT по локусу rs1042838 PGR. По данным генотипирования женщина К. должна быть включена в группу лиц с высоким риском развития преэклампсии с последующим наблюдением. В результате дальнейшего наблюдения, данной женщине был установлен диагноз: умеренная преэклампсия на сроке 27 недель.

Применение данного способа позволит на прегравидаром этапе формировать среди

женщин без отягощенного семейного анамнеза по ПЭ группы риска и своевременно реализовывать в этих группах необходимые лечебно-профилактические мероприятия по предупреждению развития преэклампсии.

5 (57) Формула изобретения

Способ прогнозирования риска развития преэклампсии с учетом генетических факторов у женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья, не имеющих отягощенного семейного анамнеза по преэклампсии, включающий выделение ДНК из периферической венозной крови и анализ
10 полиморфизма гена рецептора прогестерона (PGR), прогноз высокого риска развития преэклампсии при выявлении аллеля Т полиморфного локуса rs1042838 гена PGR.

15

20

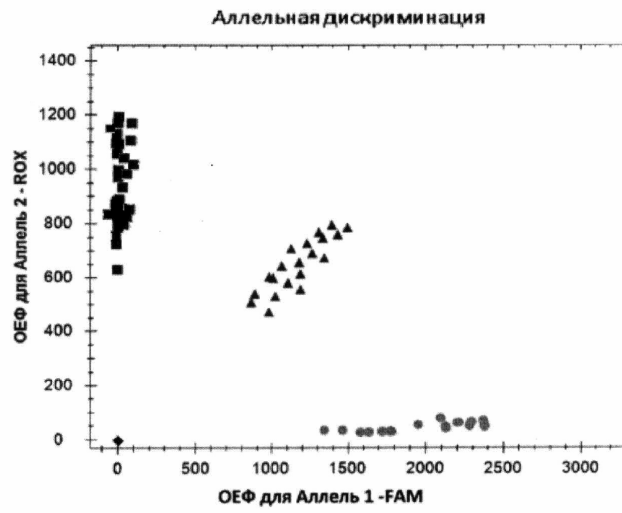
25

30

35

40

45



Фиг. 1