



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 33/48 (2018.08)

(21)(22) Заявка: 2018109374, 16.03.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.03.2018

Дата регистрации:
05.02.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 16.03.2018

(45) Опубликовано: 05.02.2019 Бюл. № 4

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. Анализ
распределения молекулярно-генетических
маркеров rs4633 и rs7766109 у больных
гиперпластическими процессами матки /
И.В. Кривошей, О.Б. Алтухова, В.С. Орлова,
И.В. Батлуцкая // Медицинская генетика. -
2015. - N 10, вып. 30. - С. 91-96. I.V.
PONOMARENKO ET AL. Genetic factors of
uterine (см. прод.)

(54) Способ прогнозирования риска развития сочетания миомы матки и гиперпластических процессов эндометрия

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицинской диагностики, в частности к способу прогнозирования риска развития сочетания миомы матки и гиперпластических процессов эндометрия. Способ включает выделение ДНК из периферической венозной крови, анализ комбинации полиморфизмов генов rs4633, rs757647, rs555621. Фактором риска развития сочетания миомы матки и гиперпластических процессов эндометрия у женщин является

комбинация аллеля C rs4633 с аллелем C rs757647, с аллелем A rs555621. Изобретение обеспечивает получение критериев оценки риска развития сочетания миомы матки и гиперпластических процессов эндометрия у женщин русской национальности, уроженок Центрального Черноземья на основе данных о комбинации генетических вариантов локусов rs4633, rs757647 и rs555621. 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: **2018109374, 16.03.2018**

(24) Effective date for property rights:
16.03.2018

Registration date:
05.02.2019

Priority:

(22) Date of filing: **16.03.2018**

(45) Date of publication: **05.02.2019** Bull. № 4

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 FORECASTING RISK OF DEVELOPMENT OF COMBINATION OF UTERINE FIBROID AND ENDOMETRIAL HYPERPLASTIC PROCESSES**

(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 fibroid and endometrial hyperplastic processes. Method includes isolation of DNA from peripheral venous blood, analysis of a combination of rs4633, rs757647, rs555621 gene polymorphisms. Risk factor for the development of uterine fibroids and endometrial hyperplastic processes in women is the combination of

the rs4633 C allele with the rs757647 C allele and the rs555621 A allele.

EFFECT: invention provides criteria for assessing the risk of developing a combination of uterine fibroids and endometrial hyperplastic processes in women of Russian nationality, natives of the Central Black Soil Region, based on data on a combination of genetic variants of rs4633, rs757647 and rs555621 loci.

1 cl, 3 ex

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

5 Добракачественные пролиферативные заболевания матки, к которым относятся миома матки, гиперпластические процессы эндометрия занимают лидирующее место в структуре гинекологических заболеваний.

Миома матки представляет собой доброкачественную моноклональную опухоль из гладкомышечных клеток миометрия. Она является одной из наиболее распространенных доброкачественных новообразований у женщин в большинстве стран мира. По
10 литературным данным, миома матки встречается у 30-35% женщин репродуктивного возраста, а в перименопаузальном периоде регистрируется у 60% индивидуумов [Wise L.A., Laughlin-Tommaso S.K. Epidemiology of Uterine Fibroids – From Menarche to Menopause // Clinical obstetrics and gynecology. 2016. V. 59(1). P. 2-24]. По различным данным, оперативные вмешательства проводятся у 25 - 50% женщин с диагнозом миома матки
15 [Gurusamy K.S., Vaughan J., Fraser I.S., et al. Medical Therapies for Uterine Fibroids – A Systematic Review and Network Meta-Analysis of Randomised Controlled Trials // PLoS One. 2016. V. 11(2). e0149631].

Гиперпластические процессы эндометрия представляют собой хроническое прогрессирующее заболевание, сопровождающееся патологической диффузной или
20 очаговой пролиферацией железистого и стромального компонента слизистой оболочки матки [Daya D. Endometrial hyperplasia and carcinoma with superimposed secretory changes: a double whammy // J. Gynecological Pathology. 2014. V. 33(2). P. 105-106]. В последние годы отмечен рост заболеваний эндометрия среди женщин всех возрастных групп. На долю данной патологии среди гинекологических заболеваний приходится от 10 до 50%,
25 причем процент трансформации в рак эндометрия составляет от 5 до 10%. [Boyrac G., Başaran D., Salman M.C., et. al. Does Preoperative Diagnosis of Endometrial Hyperplasia Necessitate Intraoperative Frozen Section Consultation? // J. Balkan Med. 2016. V. 33(6). P. 657–661]. Около 40% женщин молодого возраста с гиперпластическими процессами эндометрия подвергаются хирургическому лечению, что зачастую приводит к потере
30 репродуктивной функции [Kadirogullari P., Atalay C.R., Ozdemir O., Erkan M. Sari Prevalence of Co-existing Endometrial Carcinoma in Patients with Preoperative Diagnosis of Endometrial Hyperplasia // J. Clin. Diagn. Res. 2015. V. 9(10). QC10–QC14].

Согласно литературным данным, сочетание миомы матки с гиперпластическими процессами эндометрия наблюдается у 30-35% пациенток, что обусловлено сходством
35 преморбидного фона, клинических проявлений этиологии и патогенеза [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]. Сочетанное развитие данных
40 заболеваний является причиной значительного снижения качества жизни женского населения и создает значительные трудности при проведении дифференциального диагноза и выборе адекватного метода лечения.

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

В изученной научно-медицинской и доступной патентной литературе авторами не

было обнаружено способа прогнозирования риска развития сочетания миомы матки и гиперпластических процессов эндометрия на основе данных о комбинации генетических вариантов локусов rs4633, rs757647 и rs555621.

5 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 гиперпластических процессов эндометрия на основе молекулярно-генетических данных в зависимости от полиморфных маркеров генов rs4633, rs757647 и rs555621.

10 В патенте РФ №2466390 (по заявке №2011105301/15, 20.08.2012) «Способ прогнозирования развития рака тела матки при патологических процессах эндометрия у женщин репродуктивного возраста», заключающийся в определении клинических признаков и проведении метилирования генов MLH1, RASSF1, GSTP1, p16, RAR-b, CDX1, вычисляют коэффициент вероятности развития рака тела матки. При величине p больше 0,6 прогнозируют высокую вероятность развития рака тела матки, при p ,
15 равном 0,3-0,59, - умеренную вероятность развития рака, при p ниже 0,29 - низкую вероятность развития рака.

Недостаток метода заключается в том, что он позволяет прогнозировать вероятность развития рака тела матки при уже имеющихся патологических процессах эндометрия у женщин репродуктивного возраста и не дает возможность спрогнозировать риск
20 развития сочетания миомы матки и гиперпластических процессов эндометрия среди здоровых женщин.

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
25 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
30 -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.

35 Недостаток прототипа заключается в том, что он позволяет прогнозировать риск развития сочетания трех нозологических единиц – миомы матки, эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия, которое среди женщин встречается значительно реже по сравнению с сочетанием миомы матки и гиперпластических процессов эндометрия. Согласно данным литературы, сочетание миомы матки совместно
40 с гиперпластическими процессами эндометрия регистрируется в 30-35% случаев, а с генитальным эндометриозом - 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.
45 В. И. Кулакова, 2015. – 92 с]. Кроме того, необходимо исследовать 6 полиморфных локусов.

Задачей настоящего исследования является расширение арсенала способов диагностики, а именно создание способа прогнозирования риска развития сочетания

миомы матки и гиперпластических процессов эндометрия на основе данных о сочетании однонуклеотидных полиморфизмов генов – rs4633, rs757647 и rs555621.

5 Технический результат использования изобретения – получение критериев оценки риска развития сочетания миомы матки и гиперпластических процессов эндометрия у женщин русской национальности, уроженок Центрального Черноземья на основе данных о комбинации генетических вариантов локусов rs4633, rs757647 и rs555621.

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

10 - выделение ДНК из периферической венозной крови;
 - анализ полиморфизмов генов rs4633, rs757647 и rs555621;
 - прогнозирование повышенного риска развития сочетания миомы матки и гиперпластических процессов эндометрия у женщин русской национальности, уроженок Центрального Черноземья в случае выявления комбинации аллеля С rs4633 с аллелем
 15 С rs757647 с аллелем А rs555621.

Новизна и изобретательский уровень заключаются в том, что из уровня техники не известна возможность прогноза риска развития сочетания миомы матки и гиперпластических процессов эндометрия по данным о комбинации генетических вариантов локусов rs4633, rs757647 и rs555621.

20 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-НСl (рН=7,6). Полученную смесь перемешивают и центрифугируют при 4°С, 4000 об./мин. в течение 20 минут.

25 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°С в течение 16 часов.

30 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
 35 используют для проведения полимеразной цепной реакции синтеза ДНК.

Анализ всех локусов (rs4633, rs757647 и rs555621) 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
 40 зондов, синтезированных фирмой «Синтол» с последующим анализом полиморфизмов методом дискриминации аллелей. Для дискриминации аллелей используют программу Bio-Rad «IQ5-Standart Edition».

45 Возможность использования предложенного способа для оценки риска развития сочетания миомы матки и гиперпластических процессов эндометрия подтверждает анализ результатов наблюдений 170 женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья РФ, имеющих сочетание миомы матки с гиперпластическими процессами эндометрия 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 гиперпластических процессов эндометрия, 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 rs4633, rs757647 и rs555621 в формировании сочетания миомы матки и гиперпластических процессов эндометрия проводили 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 концентрации комбинации генетических вариантов C rs4633 с C rs757647 с A rs555621 между больными с сочетанием миомы матки и гиперпластических процессов эндометрия (73,17%) и контрольной группой (58,12%). Следовательно, данная комбинация генетических вариантов является фактором риска развития сочетания миомы матки и гиперпластических процессов эндометрия ($p=0,0001$, OR=1,97, 95% CI 1,36-2,84).

Таким образом, результаты, полученные с помощью биоинформатического анализа, свидетельствуют о значимом вкладе комбинации полиморфных вариантов генов rs4633, rs757647 и rs555621 в формирование сочетания миомы матки и гиперпластических процессов эндометрия. Фактором риска развития сочетания миомы матки и гиперпластических процессов эндометрия у женщин является комбинация аллеля C rs4633 с аллелем C rs757647 с аллелем A rs555621.

В качестве примеров конкретного выполнения разработанного способа приведено генетическое обследование по локусам rs4633, rs757647 и rs555621 трех женщин (добровольцев) русской национальности, являющихся жителями Центрального Черноземья, не имеющих среди родственников 1-й степени родства больных доброкачественными пролиферативными заболеваниями матки.

Пример 1. У женщины А. была выявлена комбинация аллеля С rs4633 с аллелем С rs757647 с аллелем А rs555621. На основании этого женщина включена в группу риска по развитию сочетания миомы матки и гиперпластических процессов эндометрия. 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. была выявлена комбинация аллеля С rs4633 с аллелем С rs757647 с аллелем А rs555621. На основании этого у нее прогнозируют повышенный риск развития сочетания миомы матки и гиперпластических процессов эндометрия. Данная женщина включена в группу риска по развитию сочетания миомы матки и гиперпластических процессов эндометрия, ей назначен комплекс профилактических мероприятий по предупреждению развития миомы матки и гиперпластических процессов эндометрия (лечение хронических гинекологических заболеваний, рациональное питание, физическая активность, нормализация психо-эмоционального состояния, регулярный профилактический осмотр (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 аллеля Т rs4633 с аллелем Т rs757647 с аллелем G rs555621. На основании этих результатов у данной пациентки прогнозируют низкий риск развития сочетания миомы матки и гиперпластических процессов эндометрия, что подтверждено дальнейшим наблюдением.

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

(57) Формула изобретения

Способ прогнозирования риска развития сочетания миомы матки и гиперпластических процессов эндометрия, включающий выделение ДНК из периферической венозной крови методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК, анализ полиморфизмов, отличающийся тем, что анализируют полиморфизмы генов rs4633, rs757647 и rs555621 и прогнозируют повышенный риск развития сочетания миомы матки и гиперпластических процессов эндометрия у женщин русской национальности, уроженок Центрального Черноземья в случае выявления комбинации аллеля С rs4633 с аллелем С rs757647, с аллелем А rs555621.

40

45