



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/58 (2018.02); G01N 2800/50 (2018.02); G01N 2800/364 (2018.02); C12Q 1/6804 (2018.02); C12Q 1/6827 (2018.02); C12Q 1/6858 (2018.02); C12Q 1/686 (2018.02); C12Q 2531/113 (2018.02); C12Q 2561/113 (2018.02); C12Q 2600/118 (2018.02); C12Q 2600/156 (2018.02)

(21)(22) Заявка: 2017122604, 27.06.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.06.2017Дата регистрации:
18.04.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 27.06.2017

(45) Опубликовано: 18.04.2018 Бюл. № 11

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

Чурносов Михаил Иванович (RU),
Пономаренко Ирина Васильевна (RU),
Алтухова Оксана Борисовна (RU),
Новакова Ольга Николаевна (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 2557977 C1, 27.07.2015. RU
2468367 C1, 27.11.2012. RU 2558052 C1,
27.07.2015. ASHTON K.A. et al. Estrogen
receptor polymorphisms and the risk of
endometrial cancer. BJOG. 2009 Jul; 116(8):
1053-61. Epub 2009 May 11.

(54) Способ прогнозирования риска развития гиперпластических процессов эндометрия на основе генетических данных

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и предназначено для прогнозирования риска развития гиперпластических процессов эндометрия у женщин русской национальности, уроженок Центрального Черноземья. Из периферической венозной крови выделяют ДНК. Методом полимеразной цепной реакции анализируют полиморфизмы генов rs1398217,

rs1073768, rs4986938. В случае выявления сочетания аллеля G rs1398217 с аллелем A rs1073768 с генотипом AA rs4986938 прогнозируют повышенный риск развития гиперпластических процессов эндометрия. Изобретение обеспечивает получение новых критериев оценки риска развития гиперпластических процессов эндометрия. 3 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

G01N 33/58 (2018.02); *G01N 2800/50* (2018.02); *G01N 2800/364* (2018.02); *C12Q 1/6804* (2018.02); *C12Q 1/6827* (2018.02); *C12Q 1/6858* (2018.02); *C12Q 1/686* (2018.02); *C12Q 2531/113* (2018.02); *C12Q 2561/113* (2018.02); *C12Q 2600/118* (2018.02); *C12Q 2600/156* (2018.02)

(21)(22) Application: **2017122604, 27.06.2017**(24) Effective date for property rights:
27.06.2017Registration date:
18.04.2018

Priority:

(22) Date of filing: **27.06.2017**(45) Date of publication: **18.04.2018** Bull. № 11

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

**Polonikov Aleksej Valerevich (RU),
Novakova Olga Nikolaevna (RU),
Altukhova Oksana Borisovna (RU),
Ponomarenko Irina Vasilevna (RU),
Churnosov Mikhail Ivanovich (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 ENDOMETRIAL HYPERPLASTIC PROCESSES BASED ON GENETIC DATA

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine and is designed to predict the risk of endometrial hyperplastic processes in women of Russian nationality, natives of the Central Black-Soil Region. DNA is recovered from peripheral venous blood. Polymerase chain reaction is used to analyze gene polymorphisms rs1398217, rs1073768, rs4986938. If a combination of allele G

rs1398217 with allele A rs1073768 with AA genotype rs4986938 is detected, increased risk of endometrial hyperplastic processes is diagnosed.

EFFECT: invention provides obtaining new criteria for assessing the risk of endometrial hyperplastic processes in females.

1 cl, 3 ex

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

5 Гиперпластические процессы эндометрия – это хроническое прогрессирующее заболевание, широко распространенное среди женщин любого возраста и характеризующееся чрезмерным разрастанием слизистой оболочки матки. Распространенность данной патологии в общей популяции достигает 30%, причем процент трансформации в рак эндометрия составляет от 5 до 10%.

10 К факторам риска при развитии гиперплазии эндометрия с возможностью к малигнизации у женщин с аномальными маточными кровотечениями в возрасте до 40 лет и индексом массы тела более 30 относятся такие факторы, как отсутствие родов в анамнезе, бесплодие, ановуляция, синдром поликистозных яичников, раннее менархе, позднее наступление менопаузы, диабет, гипертензия, эстроген-заместительная терапия [Zhang H., Yan L., Bai Y., Li C. et al. Dual-specificity phosphatase 6 predicts the sensitivity of
15 progesterin therapy for atypical endometrial hyperplasia // Gynecol. Oncol. 2015. Vol. 136. P. 549-553].

У пациенток репродуктивного возраста патогенетическую основу гиперпластических процессов эндометрия составляет гиперэстрогемия и ановуляция, поэтому одним из симптомов является бесплодие. У 10% менструирующих больных и у 40% в
20 постменопаузе может наблюдаться бессимптомное течение гиперпластических процессов эндометрия.

Вероятность малигнизации гиперпластических процессов эндометрия является предметом дискуссий на протяжении более половины столетия и до сих пор до конца не установлена. Невозможность получить четкие статистические данные обусловлена
25 тем, что гиперпластические процессы эндометрия в основном определяется у женщин, которые имеют жалобы и обращаются к гинекологу, в то время как большое число женщин, не проходящих лечение, остаются необследованными. Кроме того, сложность представляет и дифференциальная диагностика между атипичической гиперплазией и высокодифференцированным раком эндометрия. В среднем риск малигнизации при
30 атипичических гиперпластических процессах эндометрия потенциальный составляет 29% [El Behery M.M., Saleh H.S., Ibrahim M.A., Kamal E.M. et al. Levonorgesterl-relasing intrauterine device versus dydrogesterone for management of endometrial hyperplasia without atypia // Reprod. Sci. 2014. Vol. 22, №3. P. 329-334].

С практической точки зрения представляется крайне необходимым выделение
35 критериев индивидуального прогнозирования у женщин риска развития гиперпластических процессов эндометрия на основании исследования генов-кандидатов с целью выявления женщин, предрасположенных к гиперпластическим процессам эндометрия.

В изученной научно-медицинской и доступной патентной литературе не было
40 обнаружено способа прогнозирования риска развития гиперпластических процессов эндометрия на основе данных о сочетании генетических полиморфизмов rs1398217, rs1073768 и rs4986938.

Для оценки сложившейся патентной ситуации был выполнен поиск по охраняемым документам за период с 1990 по 2016 гг. Анализ документов производился по
45 направлению: способ прогнозирования риска развития гиперпластических процессов эндометрия на основе молекулярно-генетических данных в зависимости от полиморфных маркеров генов rs7538038, rs1782507 и rs7589318.

В патенте РФ № 2267993 (дата публикации 20.01.2006), где предложен «Способ

ультразвуковой диагностики гиперпластических процессов эндометрия», заключающийся в регистрации срединного маточного эха - М-эхо, объема эндометрия (ОЭ), дополнительно определяют объем тела матки (ОМ) и вычисляют показатель отношения объема эндометрия к объему тела матки (ОЭ/ОМ). У женщин репродуктивного возраста в ранней стадии пролиферации показатель ОЭ/ОМ в пределах значений от 5 до 10% считают нормой, при показателях от 10 до 19% женщины составляют группу риска и им рекомендуют уз-контроль в течение 1 года, от 19 до 40% - гиперплазия эндометрия - данной группе пациенток показано диагностическое выскабливание полости матки с гистологическим исследованием, свыше 40% - женщин направляют для лечения в онкоцентр. В постменопаузальном периоде до 5 лет показатель ОЭ/ОМ в пределах значений от 3 до 7% считают нормой, при показателях от 7 до 13% - женщины составляют группу риска, и им рекомендуют уз-контроль в течение полугодия, при показателях от 13 до 35% - гиперплазия эндометрия - данной группе пациенток показано диагностическое выскабливание полости матки с гистологическим исследованием, свыше 35% - рекомендуют лечение в онкоцентре.

Недостаток метода заключается в том, что не рассматриваются генетические полиморфизмы и их сочетания с риском развития гиперпластических процессов эндометрия.

За прототип выбран патент РФ № 2557977 (дата публикации 27.07.2015) «Способ прогнозирования риска формирования гиперпластических процессов эндометрия», который заключается в выделении ДНК из периферической венозной крови у женщин русской национальности, уроженок Центрального Черноземья России, типировании и анализе сочетаний генетических полиморфизмов фактора некроза опухоли α (-308 G/A TNF α), рецептора фактора некроза опухоли 1 (+36 A/G TNFR1), интерферона индуцибельного хемоаттрактанта Т-клеток (A/G I-TAC), интерлейкина 1A (-889 C/T IL-1A), лимфотаксина α (+250 A/G Lta). Повышенный риск развития гиперпластических процессов эндометрия прогнозируют при выявлении сочетания аллелей -308 G TNF α , +36 A TNFR1, A I-TAC, -889 T IL-1A, и/или сочетания аллелей +36 A TNFR1, A I-TAC, -889 T IL-1A, и/или сочетания аллелей -308 G TNF α , +250 G Lta, -889 T IL-1A.

Недостаток метода заключается в ограниченности применения, т.к. необходимо исследовать значительное количество генетических полиморфизмов фактора некроза опухоли α (-308 G/A TNF α), рецептора фактора некроза опухоли 1 (+36 A/G TNFR1), интерферона индуцибельного хемоаттрактанта Т-клеток (A/G I-TAC), интерлейкина 1A (-889 C/T IL-1A), лимфотаксина α (+250 A/G Lta).

Задачей настоящего исследования является расширение арсенала способов диагностики, а именно создание способа прогнозирования развития гиперпластических процессов эндометрия на основе данных о сочетании однонуклеотидных полиморфизмов – rs1398217, rs1073768 и rs4986938.

Технический результат использования изобретения – получение критериев оценки риска развития гиперпластических процессов эндометрия у женщин русской национальности, уроженок Центрального Черноземья на основе данных о сочетаниях генетических вариантов локусов rs1398217, rs1073768 и rs4986938.

В соответствии с поставленной задачей был разработан способ прогнозирования риска развития гиперпластических процессов эндометрия на основе генетических данных, включающий:

- выделение ДНК из периферической венозной крови;
- анализ полиморфизмов генов rs1398217, rs1073768 и rs4986938;
- прогнозирование повышенного риска развития гиперпластических процессов

эндометрия у женщин русской национальности, уроженок Центрального Черноземья в случае выявления сочетания аллеля G rs1398217 с аллелем A rs1073768 с генотипом AA rs4986938.

Новизна и изобретательский уровень заключаются в том, что из уровня техники не известна возможность прогноза риска развития гиперпластических процессов эндометрия по данным о сочетании генетических вариантов локусов rs1398217, rs1073768 и rs4986938.

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 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 мин. 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 K (10 мг/мл) и инкубируют образец при 37°C в течение 16 ч.

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 мин. 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 -200°C. Выделенную ДНК использовали для проведения полимеразной цепной реакции синтеза ДНК.

Анализ всех локусов (rs1398217, rs1073768 и rs4986938) осуществляют методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК. ПЦР проводилась 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 использовалась программа Bio-Rad «IQ5-Standart Edition».

Возможность использования предложенного способа для оценки риска развития гиперпластических процессов эндометрия подтверждает анализ результатов наблюдений 520 женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья РФ больных гиперпластическими процессами эндометрия и 981 человек контрольной группы. Обследование пациенток проводилось врачами гинекологического отделения и отделения вспомогательных репродуктивных технологий перинатального центра Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа. В контрольную группу включались женщины, не имеющие пролиферативных заболеваний органов малого таза и доброкачественных заболеваний молочных желез. Формирование контрольной выборки осуществлялось при профилактических осмотрах (диспансеризации). Обследование женщин проводилось врачами 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 включались индивидуумы только после установления диагноза

гиперпластических процессов эндометрия, подтвержденного с помощью клинических, клиничко-инструментальных и клиничко-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 комбинаций генетических вариантов rs1398217, rs1073768 и rs4986938 в формировании гиперпластических процессов эндометрия проводилось 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].

Выявлено, что сочетание аллеля G rs1398217 с аллелем A rs1073768 с генотипом AA rs4986938 имеют 8,45% больных гиперпластическими процессами эндометрия, а в контрольной группе оно выявлено у 4,75%. Эта комбинация полиморфных вариантов генов является фактором риска развития гиперпластических процессов эндометрия, о чем свидетельствует величина OR, равная 1,85 при 95% доверительном интервале 1,20-2,84, $p=0,004$.

Таким образом, результаты, полученные с помощью биоинформатического анализа, свидетельствуют о вовлеченности комбинации полиморфных вариантов генов rs1398217, rs1073768 и rs4986938 в формирование гиперпластических процессов эндометрия. Фактором риска развития гиперпластических процессов эндометрия у женщин является сочетание аллеля G rs1398217 с аллелем A rs1073768 с генотипом AA rs4986938.

В качестве примеров конкретного выполнения разработанного способа приведено генетическое обследование по локусам rs1398217, rs1073768 и rs4986938 двух женщин-добровольцев русской национальности, являющихся жителями Центрального Черноземья, не имеющих среди родственников 1-й степени родства больных гиперпластическими процессами эндометрия.

Пример 1. У женщины А. было выявлено сочетание аллеля G rs1398217 с аллелем A rs1073768 с генотипом AA rs4986938. На основании этого женщина включена в группу риска по развитию гиперпластических процессов эндометрия. Повторное обследование через 1 год подтвердило обоснованность прогноза. Назначен комплекс лечебных мероприятий, регулярный профилактический осмотр (посещение гинеколога раз в 6 мес).

Пример 2. У женщины В. было выявлено сочетание аллеля G rs1398217 с аллелем A rs1073768 с генотипом AA rs4986938. На основании этого женщина включена в группу риска по развитию гиперпластических процессов эндометрия и ей назначен комплекс профилактических мероприятий по предупреждению развития данного заболевания (лечение хронических гинекологических заболеваний, нормализация веса, физическая активность, контроль показателей артериального давления и уровня глюкозы в крови, нормализация психоэмоционального состояния, регулярный профилактический осмотр (посещение гинеколога раз в 6 мес) и др.). Повторные осмотры подтвердили

эффективность проведенного комплекса профилактических мероприятий.

Пример 3.

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

(57) Формула изобретения

10 Способ прогнозирования риска развития гиперпластических процессов эндометрия на основе генетических данных у женщин русской национальности, уроженок Центрального Черноземья, включающий выделение ДНК из периферической венозной крови, методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК проводят анализ полиморфизмов, отличающийся тем, что анализируют полиморфизмы генов rs1398217, rs1073768, rs4986938 и прогнозируют повышенный риск развития гиперпластических 15 процессов эндометрия в случае выявления сочетания аллеля G rs1398217 с аллелем A rs1073768 с генотипом AA rs4986938.

20

25

30

35

40

45