



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
C12Q 1/6883 (2006.01); C12Q 2600/156 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2017113408, 18.04.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
18.04.2017

Дата регистрации:  
14.05.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 18.04.2017

(45) Опубликовано: 14.05.2018 Бюл. № 14

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

Чурносов Михаил Иванович (RU),  
Овчарова Вероника Сергеевна (RU),  
Акулова Людмила Юрьевна (RU),  
Зарудская Оксана Мирославовна (RU),  
Добродомова Ирина Сергеевна (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: Овчарова В. С. О распределении  
аллелей и генотипов локуса-1306с/т ММР-  
2 у женщин с преэклампсией //Медицина и  
образование в Сибири. - 2013, - п. 6. RU  
2568892 C1 от 28.08.2014.

(54) Способ прогнозирования риска развития преэклампсии тяжелого течения с учетом генетических данных

(57) Реферат:

Изобретение относится к генетике. Описан способ прогнозирования риска возникновения преэклампсии тяжелого течения у женщин русской национальности, уроженках Центрального Черноземья, относится к области медицинской диагностики. Способ включает выделение ДНК из периферической венозной крови. Анализ полиморфизмов генов ММР-2 (rs243865), ММР-8 (rs11225395), ММР-8 (rs1320632), ММР-9 (rs17577). Фактором риска развития ПЭ тяжелого течения является сочетание

генетических вариантов G ММР-9 (rs17577) и G ММР-2 (rs243865). Комбинация T ММР-8 (rs11225395) и A ММР-9 (rs17577) имеет протективное значение для формирования преэклампсии тяжелого течения. Изобретение может быть использовано в акушерстве для прогнозирования осложнений во второй половине беременности, а именно риска развития преэклампсии (далее ПЭ) тяжелого течения с учетом генетических данных. 5 ил., 4 пр.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*C12Q 1/6883 (2006.01); C12Q 2600/156 (2006.01)*(21)(22) Application: **2017113408, 18.04.2017**(24) Effective date for property rights:  
**18.04.2017**Registration date:  
**14.05.2018**

Priority:

(22) Date of filing: **18.04.2017**(45) Date of publication: **14.05.2018** Bull. № 14

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

**Churnosov Mikhail Ivanovich (RU),  
Ovcharova Veronika Sergeevna (RU),  
Akulova Lyudmila Yurevna (RU),  
Zarudskaya Oksana Miroslavovna (RU),  
Dobrodomova Irina Sergeevna (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 PREDICTION OF SEVERE PREECLAMPSIA DEVELOPMENT RISK CONSIDERING GENETIC DATA**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: method for severe preeclampsia risk prediction for Russian women, natives of Central Black Earth Region, relates to the field of medical diagnostics. The method involves DNA isolation from the peripheral venous blood. Analysis of MMP-2 (rs243865), MMP-8 (rs11225395), MMP-8 (rs1320632), MMP-9 (rs17577) genes polymorphisms. The risk factor for development of severe PE is a combination of genetic variants G

MMP-9 (rs17577) and G MMP-2 (rs243865). The combination of T MMP-8 (rs11225395) and A MMP-9 (rs17577) has a protective value for formation of severe preeclampsia.

EFFECT: invention can be used in obstetrics for prediction of complications in the second half of pregnancy, namely the risk of severe preeclampsia, considering the genetic data.

5 dwg, 4 ex

Изобретение относится к области медицинской диагностики, может быть использовано в акушерстве для прогнозирования осложнений во второй половине беременности, а именно риска развития преэклампсии (далее ПЭ) тяжелого течения с учетом генетических данных.

- 5 Преэклампсия - осложнение беременности, характеризующееся развитием эндотелиальной дисфункции, полиорганной недостаточностью, нарушением свертывающей и противосвертывающей систем, микроциркуляции, обменных процессов, иммунного ответа [Серов В.Н. Клинические рекомендации. Акушерство и гинекология. - 4-е изд. / В.Н. Серов, Г.Т. Сухих. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. - 1024 с.; Eiland, E. Preeclampsia / E. Eiland, C. Nzerue, M. Faulkner // J. Pregnancy, 2012. - P. 586—578].

10 В настоящее время преэклампсия является одной из самых актуальных проблем современного акушерства ввиду широкой распространенности, сложности этиопатогенеза, высокой частоты материнской и перинатальной заболеваемости и смертности [Киселева Н.И. Маркеры дисфункции эндотелия при гестозе [Текст] / Н.И. Киселева, С.Н. Занько, А.П. Солодков // Дисфункция эндотелия : эксперим. и клинич. 15 исслед. : тр. III междунар. науч.-практ. конф., Витебск, 18-20 мая 2004 г. / Белорус. респ. Фонд фундамент. исслед. ; Витеб. гос. мед. ун-т. – Витебск, 2004. – С. 201-204]. ПЭ может варьировать от легкой до тяжелой формы. Как правило, в тяжелых случаях преэклампсии единственным способом улучшить состояние пациентки является ее 20 родоразрешение.

Для преэклампсии характерно прогрессирующее течение. Это выражается в неуклонном нарастании тяжести отдельных ее проявлений или присоединении новых клинических признаков. При наличии преэклампсии могут развиваться такие критические состояния, как отслойка плаценты, ДВС–синдром, церебральные 25 кровоизлияния, печеночная недостаточность, острая почечная недостаточность, гипотрофия, гибель плода, эклампсия [Эндотелиальная дисфункция при гестозе. Патогенез, генетическая предрасположенность, диагностика и профилактика [Текст]: метод. рекомендации / Е.В. Мозговая, О.В. Малышева, Т.Э. Иващенко [и др.] ; ред. Э.К. Айламазян. – Санкт-Петербург: Изд-во Н-Л, 2003. – 32 с.].

30 Данные о молекулярных и клеточных механизмах развития преэклампсии, плацентарного гомеостаза и адаптационно-гомеостатических реакций плаценты при преэклампсии многочисленны, но разноречивы: недостаточно изучены регуляторные механизмы, обеспечивающие рост, структуру и функционирование всего фетоплацентарного комплекса [Roberts J.M. Preeclampsia and soluble fms-like tyrosine 35 kinase 1 [Text] / J.M. Roberts, A. Rajakumar // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2009. – Vol. 94, № 7. – P. 2252-2254].

В настоящее время принято считать, что преэклампсия протекает в две стадии [Kang, A. Pre-eclampsia screening in first and second trimester [Text] / A. Kang, H. Struben // Ther. Umsch. – 2008. – Vol. 65, № 11. – P. 663-666]. На первой происходит нарушение 40 взаимоотношений между инвазией раннего трофобласта и ремоделированием спиральных артерий, которое приводит к недостаточному кровоснабжению плаценты и оксидантному стрессу ее тканей [Медведев Б.И. Клинико-биохимические предикторы развития преэклампсии [Текст] / Б.И. Медведев, Е.Г. Сяндюкова, С.Л. Сашенков // Акушерство и гинекология. – 2013. – № 5. – С. 30-35]. На второй стадии развивается 45 «материнский синдром», проявляющийся в виде генерализованного системного воспалительного ответа, в который вовлечены как лейкоциты, так и эндометрий [Некоторые аспекты патогенеза преэклампсии у беременных [Текст] / В.Г. Левченко, В.Н. Зорина, Л.Г. Баженова [и др.] // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2010.

– Т. 10, № 3. – С. 21-25].

Как свидетельствуют результаты ряда исследований, значимую роль в развитии преэклампсии играют генетические факторы. Среди генов-кандидатов важное значение в развитии ПЭ отводится генам матриксных металлопротеиназ. К этой группе генов относятся: MMP-1 (rs1799750), MMP-2 (rs243865), MMP-3 (rs3025058), MMP-7 (rs11568818), MMP-8 (rs1320632), MMP-8 (rs11225395), MMP-9 (rs17577), MMP-12 (rs652438).

Матриксная металлопротеиназа-2 (MMP-2) - протеиназа внеклеточного матрикса человека, которая секретируется в качестве негликозилированного профермента. Ген MMP-2 расположен на длинном плече 16 хромосомы (16q12.2). Установлена вовлеченность полиморфизма MMP-2 (rs243865) в развитие инфаркта миокарда, метаболического синдрома, склерозирующего холангита, аневризмы восходящего отдела аорты, рака мочевого пузыря и т.д. [Анализ полиморфизма генов матриксных металлопротеиназ-2 и -9 у пациентов с ишемической болезнью сердца [Текст] / А.В. Шевченко, О.В. Голованова, В.И. Коненков [и др.] // Терапевтический архив. – 2010. – Т. 82, № 1. – С. 31-34].

Матриксная металлопротеиназа-8 (MMP-8) или нейтрофильная коллагеназа содержится в специфических гранулах полиморфноядерных лейкоцитов в виде неактивного профермента. Ген MMP-8 находится на 11 хромосоме в области 11q22.2–q22.3. В гене наиболее изучены два полиморфных локуса с однонуклеотидными заменами в кодирующей области MMP-8 (rs11225395) и MMP-8 (rs1320632). Данные полиморфизмы связаны с преждевременным разрывом плодных оболочек, хроническим и острым периодонтитом, развитием рака молочной железы, рака легких и атеросклерозом сонных артерий [Matrix metalloproteinase 8 (MMP8) gene polymorphisms in chronic periodontitis [Text] / L. Izakovicova Holla, B. Hrdlickova, J. Vokurka [et al.] // Arch. Oral Biol. – 2012. – Vol. 57, № 2. – P. 188-196].

Матриксная металлопротеиназа-9 (MMP-9) вовлечена в процессы воспаления, ремоделирования ткани и репарации, мобилизации матрикс-связанных факторов роста и процессинга цитокинов [Матриксные металлопротеиназы, их роль в физиологических и патологических процессах [Текст]: обзор / Л.Н. Рогова, Н.В. Шестернина, Т.В. Замечник [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. – 2011. – Т. 18, № 2. – С. 86-89]. Ген MMP-9 локализован на 20 хромосоме (20q11-q13). Согласно литературным данным изучаемый полиморфизм MMP-9 (rs17577) является фактором риска развития рака молочной железы и желчного пузыря, астмы у детей и болезни Бехчета [Association of MMP-9 gene polymorphisms with Behçet's disease risk [Text] / A. Naouali, W. Kaabachi, K. Tizaoui [et al.] // Immunol. Lett. – 2015. – Vol. 164, № 1. – P. 18-24].

Известен способ по заявке РФ №2012131290 (дата публикации заявки 27.01.2014), согласно которому для раннего выявления риска развития преэклампсии у беременной женщины на ранней стадии беременности на сроке от 14 до 16 недель беременности до развития обычных клинических симптомов проводят анализ исследуемого биологического образца для определения концентрации 5-гидрокситриптофана, причем пониженная концентрация 5-гидрокситриптофана относительно контрольной концентрации при нормальной беременности коррелирует с риском развития преэклампсии у беременной женщины. При этом контрольная концентрация представляет собой концентрацию 5-гидрокситриптофана в биологическом образце, полученном у субъекта, у которого действительно развилась преэклампсия, и в котором повышенная концентрация 5-гидрокситриптофана относительно контрольной концентрации коррелирует с риском развития преэклампсии у беременной женщины. Одновременно проводят анализ для определения концентрации по существу всех

биомаркеров: 5-гидрокситриптофана, моносахарида, деканоилкарнитина, метилглутаровой кислоты и/или адипиновой кислоты, олеиновой кислоты, докозагексаеновой кислоты и/или докозатрииновой кислоты, -бутиролактона и/или оксолан-3-она, 2-оксовалериановой кислоты и/или оксометилбутановой кислоты, ацетоуксусной кислоты, гексадеценилэйкозатетраеноил-sn-глицерина, сфингозин-1-фосфата, сфинганин-1-фосфата и производных витамина D3, и установления корреляции концентрации и комбинации всех биомаркеров с риском развития преэклампсии у беременной женщины.

В патенте РФ № 2586412 (дата публикации 10.06.2016) предложен способ оценки риска возникновения патологии беременности, заключающийся в том, что для оценки риска возникновения преэклампсии, преждевременных родов, а также преэклампсии на фоне артериальной гипертензии проводят анализ биологических жидкостей человека, а именно сыворотки крови, с помощью обращенно-фазовой жидкостной хроматографии с регистрацией результата анализа в ультрафиолетовой области спектра, а в качестве биомаркеров патологии беременности используются гипоксантин, ксантин, мочевая кислота.

Общий недостаток указанных способов заключается в том, что не рассматриваются генетические полиморфизмы и их сочетания с риском развития преэклампсии тяжелого течения.

За прототип выбран «Способ прогнозирования риска развития преэклампсии тяжелого течения» по патенту РФ № 2568892 по заявке 2014135186/15, 28.08.2014. Заявляемый способ позволяет прогнозировать развитие преэклампсии тяжелого течения с учетом генетических полиморфизмов генов цитокинов. Способ заключается в том, что выделяют ДНК из периферической венозной крови и анализируют генетические полиморфизмы: -308 G/A TNF $\alpha$  (rs1800629), +36 A/G TNFR1 (rs767455), -801 G/A SDF1 (rs1801157), C/G MCP-1 (rs285765). Повышенный риск развития преэклампсии тяжелого течения прогнозируют при наличии сочетания генетических вариантов -801A SDF1, +36 GG TNFR1 и -308 A TNF $\alpha$ . Пониженный риск развития преэклампсии тяжелого течения прогнозируют при наличии сочетания генетических вариантов -801 G SDF1 и G MCP (rs 285765). Использование изобретения позволяет повысить эффективность выявления преэклампсии тяжелого течения.

Задачей настоящего исследования является расширение арсенала способов диагностики, а именно создание способа прогнозирования риска развития тяжелого течения ПЭ по данным о генетических полиморфизмах - MMP-2 (rs243865), MMP-8 (rs11225395), MMP-8 (rs1320632), MMP-9 (rs17577).

Технический результат использования изобретения – получение критериев оценки риска развития преэклампсии тяжелого течения.

В соответствии с поставленной задачей был разработан способ прогнозирования преэклампсии тяжелого течения у женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья России, включающий:

- выделение ДНК из периферической венозной крови;
- анализ полиморфизмов генов матриксных металлопротеиназ MMP-2 (rs243865), MMP-8 (rs11225395), MMP-8 (rs1320632), MMP-9 (rs17577);
- прогнозирование максимального риска развития преэклампсии тяжелого течения при выявлении сочетания генетических вариантов матриксных металлопротеиназ - MMP-8 (rs1320632), MMP-9 (rs17577);
- прогнозирование минимального риска развития преэклампсии тяжелого течения при выявлении сочетания генетических вариантов матриксных металлопротеиназ -

ММР-2 (rs243865), ММР-9 (rs17577);

Новизна и изобретательский уровень заключаются в том, что из уровня техники не известна возможность прогноза развития преэклампсии тяжелого течения у беременных по наличию различных сочетаний генетических вариантов полиморфизмов ММР-2 (rs243865), ММР-8 (rs11225395), ММР-8 (rs1320632), ММР-9 (rs17577).

Способ осуществляют следующим образом.

ДНК выделяют из образцов периферической венозной крови пациентки в 2 этапа. На первом этапе к 4 мл крови добавляют 25 мл лизирующего буфера, содержащего 320мМ сахарозы, 1% тритон X-100, 5мМ MgCl<sub>2</sub>, 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 -20°C.

Выделенную ДНК затем подвергают полимеразной цепной реакции с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров.

Изобретение характеризуется следующими графическими материалами:

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 ММР-2 (rs243865) (- гомозигота СС ММР-2 (rs243865), - гомозигота ТТ ММР-2 (rs243865), - гетерозигота СТ ММР-2 (rs243865), - отрицательный контроль).

Фиг. 2. 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 ММР-8 (rs1320632) (- гомозигота АА ММР-8 (rs1320632), - гомозигота GG ММР-8 (rs1320632), - гетерозигота AG ММР-8 (rs1320632), - отрицательный контроль).

Фиг. 3. 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 ММР-8 (rs11225395) (- гомозигота СС ММР-8 (rs11225395), - гомозигота ТТ ММР-8 (rs11225395), - гетерозигота СТ ММР-8 (rs11225395), - отрицательный контроль).

Фиг. 4. 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 ММР-9 (rs17577) (- гомозигота GG ММР-9 (rs17577), - гомозигота АА ММР-9 (rs17577), - гетерозигота GA ММР-9 (rs17577), - отрицательный контроль).

Фиг 5. Распространенность сочетаний генетических вариантов матриксных металлопротеиназ у женщин с преэклампсией тяжелой степени и в контрольной группе.

Анализ генетического полиморфизма ММР-2 (rs243865) проводят методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad) с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров и зондов [Association of

matrix metalloproteinases (MMP2, MMP7 and MMP9) genetic variants with left ventricular dysfunction in coronary artery disease patients [Text] / A. Mishra, A. Srivastava, T. Mittal [et al.] // Clin. Chim. Acta. – 2012. – Vol. 413, № 19-20. – P. 1668-1674] с последующим анализом полиморфизма методом дискриминации аллелей. Реакционная смесь объемом 25 мкл включает: 67 mM трис-HCl (pH 8,8), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 мкг геномной ДНК, по 10 пМ каждого праймера, по 5 пкмоль каждого зонда, по 200 мкМ dATP, dGTP, dCTP, dTTP и 1 единицу активной Taq-полимеразы. После денатурации (5 мин при t+95°C) выполняют 40 циклов амплификации по схеме: отжиг праймеров – 1 мин при t+58,4°C; денатурация – 15 с при t+95°C.

При проведении ПЦР в амплификаторе с флуоресцентной детекцией (на амплификаторе CFX96) генотипирование осуществляют методом Tag Man зондов по данным величин ОЕФ (относительные единицы флуоресценции) каждого зонда. Зонд с флуоресцентным красителем ROX соответствует аллелю Т, зонд с красителем FAM – аллелю С (фиг. 1).

Анализ полиморфизма генов MMP-8 (rs11225395), MMP-8 (rs1320632) проводят методом ПЦР синтеза ДНК на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad) с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров и зондов [Elevated MMP-8 and decreased myeloperoxidase concentrations associate significantly with the risk for peripheral atherosclerosis disease and abdominal aortic aneurysm [Text] / P. Pradhan-Palikhe, P. Vikatmaa, T. Lajunen [et al.] // Scand. J. Immunol. – 2010. – Vol. 72, № 2. – P. 150-157] с последующим анализом полиморфизма методом дискриминации аллелей. Реакционная смесь объемом 25 мкл включает: 67 mM трис-HCl (pH 8,8), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 мкг геномной ДНК, по 10 пМ каждого праймера, по 5 пкмоль каждого зонда, по 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+54,6°C; денатурация – 15 с при t+95°C для MMP-8 (rs1320632) и отжиг праймеров – 1 мин при t+54,0°C; денатурация – 15 с при t+95°C для MMP-8 (rs11225395).

При проведении ПЦР в амплификаторе с флуоресцентной детекцией (на амплификаторе CFX96) генотипирование осуществляют методом Tag Man зондов по данным величин ОЕФ каждого зонда. Для MMP-8 (rs11225395) зонд с флуоресцентным красителем ROX соответствует аллелю Т, зонд с красителем FAM – аллелю С (фиг.2); для MMP-8 (rs1320632) зонд с флуоресцентным красителем ROX соответствует аллелю G, зонд с красителем FAM – аллелю А (фиг. 3).

Для исследования полиморфизма MMP-9 (rs17577) использованы наборы 2,5х реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ [<http://www.karger.com>] в объеме 25 мкл на 1 образец, включавших 2,5х реакционную смесь (2,5х ПЦР буфер: (KCl, TrisHCl (pH 8,8), 6,25 mM MgCl<sub>2</sub>), SynTaq ДНК-полимеразу, дезоксинуклеозидтрифосфаты, глицерол, Tween 20) в объеме 10мкл, 25мМ MgCl<sub>2</sub> в объеме 1,5 мкл, ddH<sub>2</sub>O (деионизированная вода), по 10 пкмоль каждого праймера и по 5 пкмоль. При проведении ПЦР в амплификаторе с флуоресцентной детекцией (на амплификаторе CFX96) генотипирование осуществлялось методом Tag Man зондов по данным величин ОЕФ каждого зонда. Зонд с флуоресцентным красителем ROX соответствует аллелю А, зонд с красителем FAM – аллелю G (фиг. 4).

Возможность использования предложенного способа для оценки риска возникновения и развития преэклампсии подтверждает анализ результатов наблюдений 468 пациенток с ПЭ и 577 женщин контрольной группы. Общий объем исследуемой выборки составил 1045 человек. Возраст у женщин с преэклампсией варьировал от 17 до 45 лет и в среднем составил 27,74±5,4 лет. Возраст беременных без ПЭ варьировал от 15 до 49 лет и в

среднем составил  $27,80 \pm 6,5$  лет. В исследуемые выборки включались индивидуумы русской национальности, являющиеся уроженцами Центрального Черноземья России и не имеющие родства между собой. Таким образом, контрольная группа не отличалась от группы женщин с ПЭ по полу, возрасту, месту рождения и национальности.

5 Все клинические и клинико-лабораторные исследования проводились на базе Перинатального центра Белгородской областной клинической больницы, с информированного согласия пациенток на использование материалов лечебно-диагностических мероприятий, проводимых за период госпитализации и после, связанных с ПЭ, для научно-исследовательских целей и протоколировались по стандартам  
10 этического комитета Российской Федерации. Анализ ассоциаций сочетаний генетических вариантов с ПЭ проведен 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 особенности «генетической конституции» беременных с ПЭ тяжелого течения по исследуемым генам матриксных металлопротеиназ (фиг. 5). Установлено, что сочетание аллелей Т MMP-2 (rs243865) и А MMP-9 (rs17577) встречается у 1,45%  
20 женщин с ПЭ III степени тяжести, что в 7,88 раз ниже аналогичного показателя контрольной группы – 11,43%. Данная комбинация является протективным фактором развития ПЭ III степени тяжести ( $pf=0,003$ ,  $pperm=0,01$  OR=0,11, 95% CI 0,01-0,83).

Наоборот, сочетание аллелей G MMP-9 (rs17577) и G MMP-8 (rs1320632) отмечается у 23,18% женщин с ПЭ III степени тяжести и у 8,76% женщин контрольной группы ( $pf=0,0007$ ,  $pperm=0,002$ , OR=3,14, 95% CI 1,67-5,92).

Резюмируя полученные данные, можно сделать вывод о значимой роли генетических полиморфизмов MMP-2 (rs243865), MMP-8 (rs11225395), MMP-8 (rs1320632), MMP-9 (rs17577) в формировании ПЭ тяжелого течения. Наличие сочетания полиморфных вариантов - G MMP-9 (rs17577), G MMP-8 (rs1320632) (OR=3,14) у женщин является  
30 признаком риска развития преэклампсии тяжелого течения. Наличие сочетания полиморфных вариантов Т MMP-2 (rs243865), А MMP-9 (rs17577) (OR=0,11) является протективным фактором развития преэклампсии тяжелого течения.

Примеры конкретного выполнения.

1. У беременной С., русской национальности, уроженки Центрального Черноземья,  
35 была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров было выявлено сочетание двух генетических вариантов Т MMP-2 (rs243865) и А MMP-9 (rs17577), что позволило отнести ее в группу беременных с пониженным риском развития преэклампсии тяжелого течения. Это подтвердило дальнейшее наблюдение. В течение беременности у нее не было выявлено признаков ПЭ тяжелого течения.

40 2. У женщины М., при прегравидарной подготовке, была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров было выявлено сочетание двух генетических вариантов Т MMP-2 (rs243865) и А MMP-9 (rs17577), что позволило отнести ее в группу беременных с пониженным риском развития ПЭ тяжелого течения. Это подтвердило дальнейшее наблюдение. При возникновении беременности у нее не было выявлено признаков ПЭ  
45 тяжелого течения.

3. У женщины Л., при прегравидарной подготовке, была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров было выявлено сочетание G MMP-9 (rs17577) и G MMP-8 (rs1320632), что позволило отнести ее в группу беременных с повышенным

риском развития ПЭ тяжелого течения. Это подтвердило дальнейшее наблюдение. При возникновении беременности были выявлены признаки преэклампсии тяжелого течения.

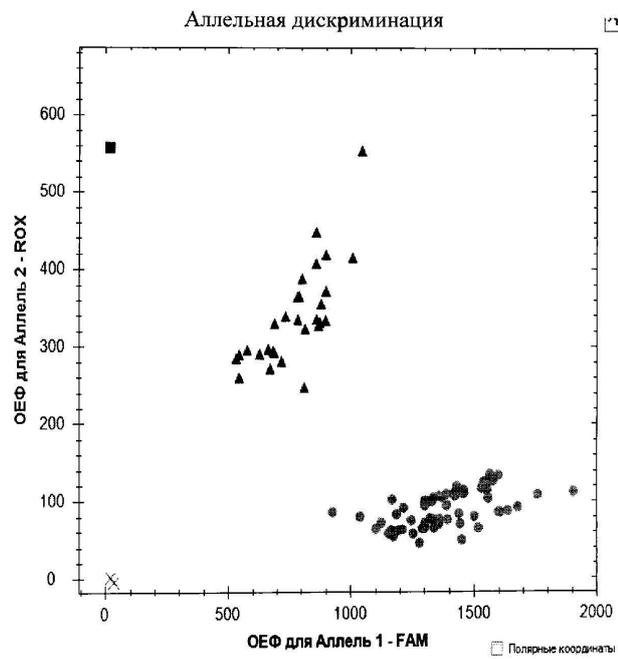
4. У беременной А., русской национальности, уроженки Центрального Черноземья, была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров было выявлено сочетание G MMP-9 (rs17577) и G MMP-8 (rs1320632), что позволило отнести ее в группу беременных с повышенным риском развития преэклампсии тяжелого течения. Это подтвердило дальнейшее наблюдение. При возникновении беременности были выявлены признаки ПЭ тяжелого течения.

Применение данного способа позволит формировать среди женщин русской национальности, уроженках Центрального Черноземья при прегравидарной подготовке и на ранних сроках беременности группы риска и своевременно реализовывать в этих группах необходимые лечебно-профилактические мероприятия по предупреждению развития преэклампсии тяжелого течения.

#### (57) Формула изобретения

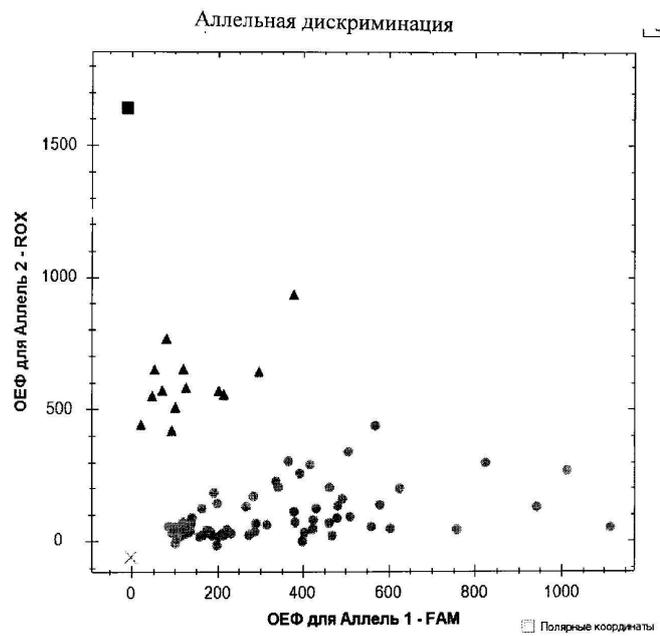
Способ прогнозирования риска возникновения преэклампсии тяжелого течения у женщин русской национальности, уроженках Центрального Черноземья, включающий выделение ДНК из периферической венозной крови, анализ генетических полиморфизмов MMP-2 (rs243865), MMP-8 (rs11225395), MMP-8 (rs1320632), MMP-9 (rs17577) и прогнозирование повышенного риска развития преэклампсии тяжелого течения при наличии сочетания генетических вариантов G MMP-9 (rs17577) и G MMP-8 (rs1320632), пониженного риска развития преэклампсии тяжелого течения - при наличии сочетания генетических вариантов T MMP-2 (rs243865) и A MMP-9 (rs17577).

Способ прогнозирования риска развития  
преэклампсии тяжелого течения с учетом генетических данных



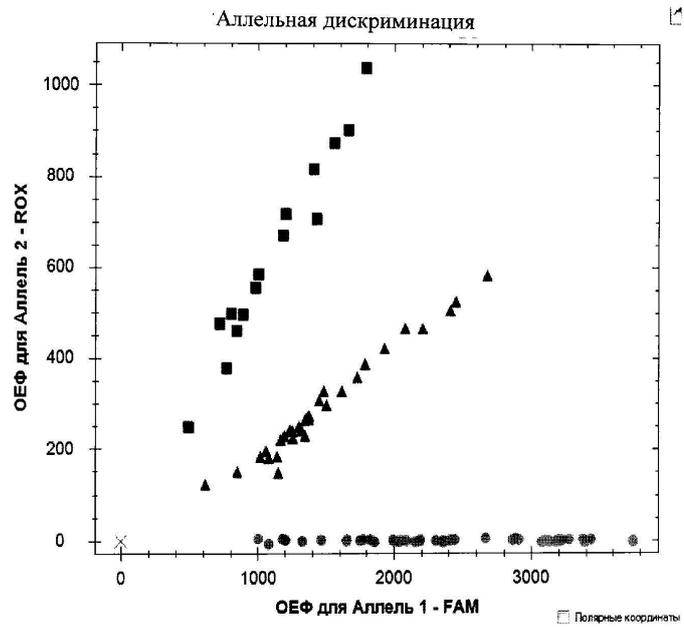
Фиг. 1

Способ прогнозирования риска развития  
преэклампсии тяжелого течения с учетом генетических данных



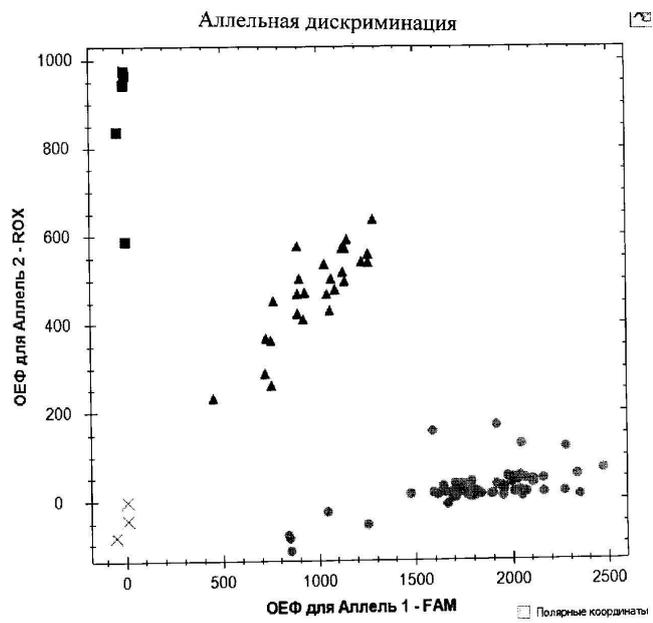
Фиг. 2

Способ прогнозирования риска развития  
преэклампсии тяжелого течения с учетом генетических данных



Фиг. 3

Способ прогнозирования риска развития  
преэклампсии тяжелого течения с учетом генетических данных



Фиг. 4

Способ прогнозирования риска развития  
преэклампсии тяжелого течения с учетом генетических данных

Распространенность сочетаний генетических вариантов матриксных металлопротеиназ у женщин с преэклампсией тяжелой степени и в контрольной группе							
Полиморфизмы	Сочетание (аллели/генотипы)	Беременные с преэклампсией тяжелой степени		Контрольная группа		P <sub>perm</sub>	OR (95% CI)
		n/N	%	n/N	%		
<i>MMP-2</i> (rs243865) <i>MMP-9</i> (rs17577)	T <i>MMP-2</i> (rs243865) A <i>MMP-9</i> (rs17577)	1/69	1,45	63/551	11,43	0,01	2,72 (1,43 - 5,17)
<i>MMP-9</i> (rs17577) <i>MMP-8</i> (rs1320632)	G <i>MMP-9</i> (rs17577) G <i>MMP-8</i> (rs1320632)	16/69	23,18	48/548	8,376	0,002	3,14 (1,67 - 5,92)

Фиг. 5