



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/582 (2018.02); *G01N 2800/50* (2018.02); *G01N 2800/361* (2018.02); *C12Q 1/6804* (2018.02); *C12Q 1/6827* (2018.02); *C12Q 1/6844* (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: 2017122981, 29.06.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.06.2017Дата регистрации:
18.04.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 29.06.2017

(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),
Сиротина Светлана 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: RU 2550933 C1, 20.05.2015.АЛТУХОВА О.Б. Изучение молекулярно-
генетических маркеров, ассоциированных
с миомой матки. Автореф. дисс. канд. мед.
наук. Москва, 2010, 18 с. [Найдено 26.02.2018]
[он-лайн]. Найдено из Интернет: URL:
[http://www.dissercat.com/content/izuchenie-
molekulyarno-geneticheskikh-markerov-
assotsiirovannykh-s-miomoi-matki](http://www.dissercat.com/content/izuchenie-molekulyarno-geneticheskikh-markerov-assotsiirovannykh-s-miomoi-matki). (см.
прод.)

(54) Способ прогнозирования риска развития миомы матки

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и предназначено для прогнозирования риска развития миомы матки у женщин русской национальности, уроженок Центрального Черноземья. Из периферической венозной крови выделяют ДНК методом полимеразной цепной реакции. Анализируют полиморфизмы генов rs7538038, rs1782507, rs7589318. Прогнозируют

повышенный риск развития миомы матки в случае выявления сочетания аллеля G rs7538038 с аллелем C rs1782507 с аллелем G rs7589318. Изобретение обеспечивает получение новых критериев оценки риска развития миомы матки у женщин русской национальности, уроженок Центрального Черноземья. 3 пр.

(56) (продолжение):

YERMACHENKO A. et al. UGT2B4 previously implicated in the risk of breast cancer is associated with menarche timing in Ukrainian females. Gene. 2016 Sep 15; 590(1): 85-9. Epub 2016 Jun 7.

R U 2 6 5 0 9 9 0 C 1

R U 2 6 5 0 9 9 0 C 1



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 33/582 (2018.02); *G01N 2800/50* (2018.02); *G01N 2800/361* (2018.02); *C12Q 1/6804* (2018.02); *C12Q 1/6827* (2018.02); *C12Q 1/6844* (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: 2017122981, 29.06.2017

(24) Effective date for property rights:
29.06.2017Registration date:
18.04.2018

Priority:

(22) Date of filing: 29.06.2017

(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):

Churnosov Mikhail Ivanovich (RU),
Ponomarenko Irina Vasilevna (RU),
Altukhova Oksana Borisovna (RU),
Novakova Olga Nikolaevna (RU),
Sirotnina Svetlana 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 RISK OF UTERINE FIBROID

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to the field of medicine and is designed to predict the risk of uterine fibroid in women of Russian nationality, natives of the Central Black-Soil Region. DNA is isolated from peripheral venous blood by polymerase chain reaction. Analyze gene polymorphisms rs7538038, rs1782507,

rs7589318. Increased risk of uterine fibroid is predicted if a combination of the allele G rs7538038 with allele C rs1782507 with allele G rs7589318.

EFFECT: invention provides new criteria for assessing the risk of uterine fibroid in women of Russian nationality, natives of the Central Black-Soil Region.

1 cl, 3 ex

RU 2 650 990 C1

RU 2 650 990 C1

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

Миома матки представляет собой наиболее распространенную доброкачественную опухоль женской половой сферы [Taylor D.K., Houthouser 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]. Согласно литературным данным, миому матки диагностируют у 30-35% женщин репродуктивного возраста, а в перименопаузальном периоде частота ее возникновения составляет около 60%.

Среди женщин, подверженных данному заболеванию, отмечается совокупность симптомов, таких как тяжелые или длительные маточные кровотечения, анемия, симптомы сдавления органов малого таза, частое мочеиспускание, хронические тазовые боли, боли при половом акте и репродуктивные осложнения. Выраженность симптомов зависит от размера, а также расположения миомы матки. Кроме того, клинические проявления при миоме матки связаны с возрастными функциональными изменениями репродуктивной системы женщины. Почти у 50% больных с миомой матки к 45-летнему возрасту нарушается ритм менструаций и с течением времени прогрессивно возрастает частота нарушений менструальной функции. Во многих странах мира миома матки является главной причиной гистерэктомии. В России, по различным данным, с миомой матки связано до 50-70% случаев гистерэктомии при заболеваниях матки. Данная патология у большей части женщин является причиной значительного ухудшения качества жизни.

Миомы матки имеют моноклональное происхождение, развиваясь из неопластических клеток миометрия, хотя сам механизм и ранние стадии развития не вполне понятны [Singh S.S., Belland L. Contemporary management of uterine fibroids: focus on emerging medical treatments // Curr. Med. Res. Opin. 2015 Jan. Vol. 31, №1. P. 1-12]. Тем не менее среди факторов, вовлеченных в формирование и последующее развитие опухоли, можно выделить мутации определенных групп генов, а также влияние половых гормонов и биохимические изменения во внеклеточной матрице миом матки.

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

В изученной научно-медицинской и доступной патентной литературе авторами не было обнаружено способа прогнозирования риска развития миомы матки на основе данных о сочетании генетических полиморфизмов rs7538038, rs1782507 и rs7589318.

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

В патенте РФ № 2350259 (дата публикации 27.03.2009), где предложен «Способ прогнозирования быстрого роста миомы матки», заключающийся в определении таких показателей как: количество медицинских аборт в анамнезе, наличие артериальной гипертензии во время предшествующих беременностей, угрозы невынашивания беременности, продолжительность родов, наличие аномалий родовой деятельности в предшествующих родах, воспалительных послеродовых заболеваний, а также хронических заболеваний желудочно-кишечного тракта и рассчитывают показатель прогноза скорости роста миомы матки.

Выявлен патент РФ №2484473 (дата публикации 10.06.2013), где предложен «Способ прогнозирования развития злокачественной или доброкачественной патологии матки», согласно которому для оценки риска развития миомы матки производят диагностическое выскабливание, определяют содержание в эндометрии прогестерона и тестостерона и при уровнях прогестерона 24,0-29,6 нг/г ткани и тестостерона от 16,8 до 22,4 нг/г ткани прогнозируют развитие миомы матки.

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

В патенте РФ №2475740 (дата публикации 20.02.2013) «Способ выявления наследственной предрасположенности к быстрому росту миомы матки», сущность которого заключается в выделении из лимфоцитов ДНК, из которой амплифицируют фрагменты генов глутатион-S-трансферазы GSTM1 и метионин-синтазы-редуктазы MTRR, и при выявлении генотипа GSTM1 del/del в сочетании с генотипом MTRR 66G/G или MTRR 66A/G делают вывод о наличии у женщины генетической предрасположенности к быстрому росту миоматозных узлов в течение 5 лет с момента их появления.

Недостаток метода заключается в том, что он позволяет прогнозировать быстрый рост миомы матки при наличии миоматозных узлов, но не дает возможности прогноза развития миомы матки.

За прототип выбран патент РФ № 2550933 (дата публикации 20.05.2015) «Способ прогнозирования риска формирования миомы матки», который заключается в выделении ДНК из периферической венозной крови, проведении типирования генетических полиморфизмов генов интерлейкинов и анализе сочетаний полиморфизмов гена интерлейкина -1 (-889 TT IL-1) и интерлейкина -5 (-703 C IL-5).

Недостаток метода заключается в его ограниченном применении, т.к. используется анализ сочетаний только генов интерлейкинов -889 TT IL-1 и -703 C IL-5.

Задачей настоящего исследования является расширение арсенала способов диагностики, а именно создание способа прогнозирования развития миомы матки на основе данных о сочетании однонуклеотидных полиморфизмов – rs7538038, rs1782507 и rs7589318.

Технический результат использования изобретения – получение критериев оценки риска развития миомы матки у женщин русской национальности, уроженок Центрального Черноземья на основе данных о сочетаниях генетических вариантов локусов rs7538038, rs1782507 и rs7589318.

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

- выделение ДНК из периферической венозной крови;
- анализ полиморфизмов генов rs7538038, rs1782507 и rs7589318;
- прогнозирование повышенного риска развития миомы матки у женщин русской национальности, уроженок Центрального Черноземья в случае выявления сочетания аллеля G rs7538038 с аллелем C rs1782507 с аллелем G rs7589318.

Новизна и изобретательский уровень заключаются в том, что из уровня техники не известна возможность прогноза риска развития миомы матки по данным о сочетании генетических вариантов локусов rs7538038, rs1782507 и rs7589318.

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, ресуспендируют. Затем прибавляют 0,4 мл 10% SDS, 35 мкл протеиназы К (10 мг/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 используют для проведения полимеразной цепной реакции синтеза ДНК.

Анализ всех локусов (rs7538038, rs1782507 и rs7589318) 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 используют программу Bio-Rad «IQ5-Standard Edition».

Возможность использования предложенного способа для оценки риска развития миомы матки подтверждает анализ результатов наблюдений 569 женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья РФ больных миомой матки и 981 человек контрольной группы. Обследование пациенток проводили врачи гинекологического отделения и отделения вспомогательных репродуктивных технологий перинатального центра Белгородской областной клинической больницы Святителю 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).

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 миомы матки, подтвержденного 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 комбинаций генетических вариантов rs7538038, rs1782507 и rs7589318 в формировании миомы матки 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].

5 Зарегистрированы различия в распространенности сочетания аллелей G rs7538038 с C rs1782507 с G rs7589318 между больными с миомой матки (26,80%) и контролем (18,83%). Эта комбинация аллельных вариантов является фактором риска формирования миомы матки ($p=0,0008$, OR=1,58, 95% CI 1,23-2,02).

10 Таким образом, результаты, полученные с помощью биоинформатического анализа, свидетельствуют о вовлеченности комбинации полиморфных вариантов генов rs7538038, rs1782507 и rs7589318 в формирование миомы матки. Фактором риска развития миомы матки у женщин является сочетание аллеля G rs7538038 с аллелем C rs1782507 с аллелем G rs7589318.

15 В качестве примеров конкретного выполнения разработанного способа приведено генетическое обследование по локусам rs7538038, rs1782507 и rs7589318 трех женщин (добровольцев) русской национальности, являющихся жителями Центрального Черноземья, не имеющих среди родственников 1-й степени родства больных миомой матки.

20 Пример 1. У женщины А. было выявлено сочетание аллеля G rs7538038 с аллелем C rs1782507 с аллелем G rs7589318. На основании этого женщина включена в группу риска по развитию миомы матки. Повторное обследование через 1 год подтвердило обоснованность прогноза. Назначен комплекс лечебных мероприятий, регулярный профилактический осмотр (посещение гинеколога раз в 6 месяцев).

25 Пример 2. У женщины В. было выявлено сочетание аллеля G rs7538038 с аллелем C rs1782507 с аллелем G rs7589318. На основании этого у нее прогнозируют повышенный риск развития миомы матки. Данная женщина включена в группу риска по развитию миомы матки, и ей назначен комплекс профилактических мероприятий по предупреждению развития миомы матки (лечение хронических гинекологических заболеваний, рациональное питание, физическая активность, нормализация психо-
30 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.

35 Пример 3. У женщины С. было выявлено сочетание аллеля A rs7538038 с аллелем A rs1782507 с аллелем A rs7589318. На основании этих результатов у данной пациентки прогнозируют низкий риск развития миомы матки, что подтверждено дальнейшим наблюдением.

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

(57) Формула изобретения

45 Способ прогнозирования риска развития миомы матки, включающий выделение ДНК из периферической венозной крови методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК, анализ полиморфизмов, отличающийся тем, что анализируют полиморфизмы генов rs7538038, rs1782507, rs7589318 и прогнозируют повышенный риск развития миомы матки у женщин русской национальности, уроженок Центрального Черноземья в случае выявления сочетания аллеля G rs7538038 с аллелем C rs1782507 с аллелем G rs7589318.