



(51) МПК
G01N 33/58 (2006.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)
C12Q 1/6827 (2018.01)
C12Q 1/686 (2018.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)
C12Q 1/6883 (2018.01)
G16B 20/20 (2019.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/582 (2025.08); *C12Q 1/6806* (2025.08); *C12Q 1/6827* (2025.08); *C12Q 1/686* (2025.08); *C12Q 1/6876* (2025.08); *C12Q 1/6883* (2025.08); *G16B 20/20* (2025.08)

(21)(22) Заявка: 2025114870, 02.06.2025

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
02.06.2025Дата регистрации:
22.12.2025

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 02.06.2025

(45) Опубликовано: 22.12.2025 Бюл. № 36

Адрес для переписки:

308015, г. Белгород, ул. Победы, 85, НИУ
"БелГУ", Крылова Анна Сергеевна

(72) Автор(ы):

Пономарева Татьяна Андреевна (RU),
Алтухова Оксана Борисовна (RU),
Пономаренко Ирина Васильевна (RU),
Чурносов Михаил Иванович (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 2386133 C1, 10.04.2010. US
20190277856 A1, 12.09.2019. РАДЗИНСКИЙ
В.Е. и др. Молекулярно-генетические
детерминанты бесплодия при генитальном
эндометриозе. Научные результаты
биомедицинских исследований. 2018; 4(3): 28-
37. ПОНОМАРЕВА Т.А. Генетические
варианты глобулина, связывающего половые
гормоны, и гормональный профиль больных
генитальным (см. прод.)

(54) Способ прогнозирования риска развития бесплодия у женщин с генитальным эндометриозом

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к гинекологии и медицинской генетике, и может быть использовано для прогнозирования риска развития бесплодия у женщин с генитальным эндометриозом. Из периферической венозной крови выделяют ДНК. Проводят анализ полиморфизмов rs8023580 гена NR2F2, rs10454142 гена PPP1R21, rs17496332 гена PRMT6. При выявлении комбинации полиморфизмов rs8023580 ТТ гена NR2F2 - rs10454142 ТТ гена PPP1R21 - rs17496332 АА гена PRMT6 прогнозируют

высокий риск развития бесплодия у женщин с генитальным эндометриозом. Способ обеспечивает получение новых критериев оценки риска развития бесплодия у женщин с генитальным эндометриозом русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья РФ и не имеющих родства между собой, на основе данных о комбинации полиморфизмов генов NR2F2, PPP1R21 и PRMT6. 3 ил., 3 пр.

(56) (продолжение):

эндометриозом. Научные результаты биомедицинских исследований. 2025; 11(1): 75-90. Принята к печати 10 октября 2024 г.

R U 2 8 5 3 2 9 3 C 1

R U 2 8 5 3 2 9 3 C 1



(51) Int. Cl.
G01N 33/58 (2006.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)
C12Q 1/6827 (2018.01)
C12Q 1/686 (2018.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)
C12Q 1/6883 (2018.01)
G16B 20/20 (2019.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G01N 33/582 (2025.08); *C12Q 1/6806* (2025.08); *C12Q 1/6827* (2025.08); *C12Q 1/686* (2025.08); *C12Q 1/6876* (2025.08); *C12Q 1/6883* (2025.08); *G16B 20/20* (2025.08)

(21)(22) Application: **2025114870, 02.06.2025**

(24) Effective date for property rights:
02.06.2025

Registration date:
22.12.2025

Priority:

(22) Date of filing: **02.06.2025**

(45) Date of publication: **22.12.2025** Bull. № 36

Mail address:
**308015, g. Belgorod, ul. Pobedy, 85, NIU "BelGU",
 Krylova Anna Sergeevna**

(72) Inventor(s):

**Ponomareva Tatiana Andreevna (RU),
 Altukhova Oksana Borisovna (RU),
 Ponomarenko Irina Vasilevna (RU),
 Churnosov Mikhail Ivanovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
 obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
 obrazovaniia "Belgorodskii gosudarstvennyi
 natsionalnyi issledovatel'skii universitet" (NIU
 "BelGU") (RU)**

(54) **METHOD FOR PREDICTING RISK OF INFERTILITY DEVELOPMENT IN WOMEN WITH GENITAL ENDOMETRIOSIS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; gynaecology; medical genetics.
 SUBSTANCE: invention can be used for predicting the risk of infertility development in women with genital endometriosis. DNA is isolated from peripheral venous blood. An analysis of polymorphisms rs8023580 of the NR2F2 gene, rs10454142 of the PPP1R21 gene, rs17496332 of the PRMT6 gene is carried out. When a combination of polymorphisms rs8023580 TT of the NR2F2 gene - rs10454142 TT of the PPP1R21 gene - rs17496332 AA of the PRMT6 gene is detected, a high

risk of infertility development in women with genital endometriosis is predicted.

EFFECT: obtaining new criteria for assessing the risk of infertility development in women of Russian nationality with genital endometriosis, who are natives of the Central Chernozem region of the Russian Federation and are not related to each other, based on data on the combination of polymorphisms of the NR2F2, PPP1R21 and PRMT6 genes.

1 cl, 3 dwg, 3 ex

RU 2 853 293 C1

RU 2 853 293 C1

Изобретение относится к области медицины, а именно к диагностике и гинекологии, медицинской генетике и может быть использовано для прогнозирования риска развития бесплодия у женщин с генитальным эндометриозом.

Эндометриоз - это хроническое иммунозависимое, дисгормональное, генетически обусловленное заболевание, которое характеризуется наличием ткани, сходной по своим морфологическим и функциональным характеристикам с эндометрием, вне полости матки [Wang P.H.; Yang S.T.; Chang W.H.; Liu C.H.; Lee F.K.; Lee W.L. Endometriosis: Part I. Basic concept. Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology. 2022. V. 61. №6. P. 927-934]. Данное заболевание имеет высокую медико-социальную значимость ввиду тяжести клинических проявлений и рецидивирующего течения [Smolarz B.; Szyłło K.; Romanowicz H. Endometriosis: Epidemiology, Classification, Pathogenesis, Treatment and Genetics (Review of Literature). International Journal of Molecular Sciences. 2021. V. 22. № 19. P.10554]. Разнообразие симптоматики эндометриоза, наличие бессимптомных форм (в 30% случаев) приводят к существенной задержке постановки диагноза [Filip L.; Duică F.; Prădatu A.; Crețoiu D.; Suciū N.; Crețoiu S.M.; Predescu D.V.; Varlas V.N.; Voinea S.C. Endometriosis Associated Infertility: A Critical Review and Analysis on Etiopathogenesis and Therapeutic Approaches // Medicina (Kaunas). 2020. V. 56. №9. P. 460]. Запоздалая диагностика и невозможность проведения своевременно начатого лечения в последующем способны привести к развитию тяжелых форм эндометриоза, которые часто сопряжены с развитием бесплодия. Бесплодие является одним из наиболее важных (и, зачастую, единственным) клиническим проявлением эндометриоза [Bouic P.J. Endometriosis and infertility: the hidden link between endometritis, hormonal imbalances and immune dysfunctions preventing implantation! // JBRA assisted reproduction. 2023. V. 27. №2. P. 144-146]. Риск развития бесплодия у женщин с эндометриозом повышен в 4 раза, эндометриоз-ассоциированное бесплодие встречается у 30-50% пациенток [Bonavina G.; Taylor H.S. Endometriosis-associated infertility: From pathophysiology to tailored treatment // Frontiers in endocrinology. 2022. V. 13. P. 1020827]. Согласно литературным данным, в патогенезе эндометриоза важную роль играют половые стероиды, за транспортировку и связывание которых ответственен глобулин, связывающий половые гормоны [Narinx N.; David K.; Walravens J.; Vermeersch P.; Claessens F.; Fiers T.; Lapauw B.; Antonio L.; Vanderschueren. Role of sex hormone-binding globulin in the free hormone hypothesis and the relevance of free testosterone in androgen physiology // Cellular and molecular life sciences: CMLS. 2022. V. 79. №11. P. 543]. ГСПГ - это транспортный белок, который регулирует уровни биодоступных форм половых гормонов, тем самым контролирует их биологическую активность [Simons P.I.H.G.; Valkenburg O.; Stehouwer C.D.A.; Brouwers M.C.G.J. Sex hormone-binding globulin: biomarker and hepatokine? Trends in endocrinology and metabolism: TEM. 2021. V. 32. №8. P. 544-553]. На сегодняшний день отсутствуют исследования, посвященные изучению роли генетических детерминант ГСПГ в развитии бесплодия у пациенток с генитальным эндометриозом, что определяет актуальность данного исследования.

В Российской Федерации отсутствуют исследования вовлеченности данных о полиморфизме генов NR2F2, PPP1R21 и PRMT6 в формировании предрасположенности к бесплодию у женщин с генитальным эндометриозом, отсутствуют данные о роли комбинации полиморфизмов генов NR2F2, PPP1R21 и PRMT6 в развитии бесплодия у женщин с генитальным эндометриозом.

Для оценки сложившейся патентной ситуации был выполнен поиск по охраняемым документам за период с 1990 по 2025 гг. Анализ документов производился по направлению: способ прогнозирования риска развития бесплодия у женщин с

генитальным эндометриозом в зависимости от данных о полиморфизме генов NR2F2, PPP1R21 и PRMT6. Источник информации: сайт Федерального института промышленной собственности <http://fips.ru>.

5 В изученной научно-медицинской и доступной патентной литературе авторами не было обнаружено способа прогнозирования риска развития бесплодия у женщин с генитальным эндометриозом на основе данных о SNP x SNP взаимодействиях и на основе данных о комбинации полиморфизмов генов NR2F2, PPP1R21 и PRMT6.

10 Известен патент (RU 2740013 C2, 30.12.2020) «Способ прогнозирования бесплодия у женщин с гипоталамическим синдромом», который заключается в определении уровней провоспалительных цитокинов (интерлейкина - 1 бета - IL-1 β , интерлейкина - 6 - IL-6, интерлейкина - 8 - IL-8, фактора некроза опухолей - альфа - TNF- α , интерферона - гамма - IFN-g) и уровни противовоспалительных цитокинов (интерлейкина - 4 - IL-4, интерлейкина - 10 - IL-10) в периферической крови у женщин с гипоталамическим синдромом.

15 Недостатком данного способа является определение риска развития бесплодия исключительно среди пациенток с гипоталамическим синдромом, что не позволяет оценить риск возникновения бесплодия среди пациенток с генитальным эндометриозом.

20 Известен патент (RU 2386133 C1, 10.04.2010) «Способ прогнозирования бесплодия у женщин-работниц нефтехимических производств», который заключается в выделении ДНК из лимфоцитов периферической венозной крови, с дальнейшим проведением генотипирования полиморфизма A2455G и T3801C гена CYP1A1 и -163C/A и -2467delT гена CYP1A2. При обнаружении гаплотипа CYP1A1*2A, генотипа *1A*1A полиморфных локусов -163C/A и -2467delT гена CYP1A2, гаплотипа CYP1A2*1D прогнозируют развитие бесплодия. При определении гаплотипа CYP1A2*1L прогнозируют устойчивость к

25 формированию бесплодия у работниц.

Недостатком данного способа является то, что он позволяет прогнозировать риск развития бесплодия только среди женщин, подвергшихся комбинированному комплексному воздействию химических веществ, но не дает возможности прогноза развития бесплодия среди пациенток с генитальным эндометриозом.

30 Известен патент (RU 2 495 431 C1, 10.10.2013) «Способ прогнозирования развития репродуктивных нарушений», который заключается в том, что у женщин берут цервикальное отделяемое на десятый день менструального цикла, в качестве параметров определяют уровни интерлейкина 1 бета и интерферона гамма одновременно. При содержании интерлейкина 1 бета больше $38,8 \pm 3,8$ пг/мл и одновременном содержании

35 интерферона гамма больше $8,1 \pm 0,5$ пг/мл прогнозируют формирование репродуктивных нарушений.

К недостаткам данного способа относятся травматичность (необходим забор материала при гинекологическом осмотре), ограниченность во времени проведения забора материала (только на 10 день менструального цикла).

40 Задачей настоящего исследования является расширение арсенала способов диагностики, а именно создание способа прогнозирования риска развития бесплодия у женщин с генитальным эндометриозом на основе данных о комбинации полиморфизмов генов NR2F2, PPP1R21 и PRMT6.

45 Технический результат использования изобретения – получение критериев оценки риска развития бесплодия у женщин с генитальным эндометриозом русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья РФ и не имеющих родства между собой, на основе данных о комбинации полиморфизмов генов NR2F2, PPP1R21 и PRMT6, включающий:

- забор периферической венозной крови;
 - выделение ДНК из периферической венозной крови;
 - анализ полиморфизмов rs8023580 гена NR2F2, rs10454142 гена PPP1R21, rs17496332 гена PRMT6;

5 - прогнозирование высокого риска развития бесплодия у женщин с генитальным эндометриозом при выявлении комбинации полиморфизмов rs8023580 ТТ гена NR2F2 x rs10454142 ТТ гена PPP1R21 x rs17496332 АА гена PRMT6.

Новизна и изобретательский уровень заключаются в том, что из уровня техники не известна возможность прогнозирования развития бесплодия у женщин с генитальным эндометриозом на основе данных о комбинации полиморфизмов rs8023580 ТТ гена NR2F2 x rs10454142 ТТ гена PPP1R21 x rs17496332 АА гена PRMT6.

Способ осуществляют следующим образом:

Выделение геномной ДНК из периферической крови осуществляют методом фенольно-хлороформной экстракции [Miller, S.A. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells / S.A. Miller, D.D. Dykes, H.F. Polesky // Nucleic. Acids. Res. - 1988. - Vol. 16, №3. - P. 1215] в два этапа. На первом этапе к 4 мл крови с ЭДТА 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°C, 4000 об./мин. в течение 20 минут. 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°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. После лиофилизации полученную ДНК растворяют в бидистиллированной, деионизованной воде и хранят при -20°C.

Анализ полиморфизмов rs8023580 гена NR2F2, rs10454142 гена PPP1R21, rs17496332 гена PRMT6 осуществлялся методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на термоциклере CFX-96 Real-Time System (Bio-Rad) с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров и зондов.

Генотипирование исследуемых образцов осуществлялось с использованием программного обеспечения «CFX-Manager™» методом дискриминации аллелей по величинам относительных единиц флуоресценции (ОЕФ) (фиг. 1, фиг. 2, фиг. 3), где:

Фигура 1 - Визуализация дискриминации полиморфизмов rs8023580 гена NR2F2 (где ● - гомозиготы ТТ, ▲ - гетерозиготы ТС, ■ - гомозиготы СС, ✕ - неопределённый образец);

Фигура 2 - Визуализация дискриминации полиморфизмов rs10454142 гена PPP1R21 (где ● - гомозиготы ТТ, ▲ - гетерозиготы ТС, ■ - гомозиготы СС, ✕ - неопределённый образец);

Фигура 3 - Визуализация дискриминации полиморфизмов rs17496332 гена PRMT6 (где ● - гомозиготы GG, ▲ - гетерозиготы AG, ■ - гомозиготы AA, ✕ - неопределённый образец).

45 Метод MDR в его модификации Mbmdr [Mbmdr: an R package for exploring gene-gene interactions associated with binary or quantitative traits / M.L. Calle, V. Urrea, N. Malats, K. Van Steen // Bioinformatics. - 2010. - Vol. 26, №17. - P. 2198-2199] применялся для изучения интерлокусных взаимодействий, ассоциированных с эндометриозом. Рассматривались

двух- и трехлокусные модели. Расчеты проводили с ковариатами в программе MB-MDR (версия 2.6) в программной среде R. Наиболее значимые модели интерлокусных взаимодействий, связанных с формированием бесплодия у женщин с генитальным эндометриозом, отбирались на основе поправки Бонферрони (при этом рассматривалось число возможных комбинаций, изучаемых SNPs генов NR2F2, PPP1R21 и PRMT6 при 2-, 3-локусных моделях). В дальнейший анализ (валидация моделей с помощью пермутационного теста) включались модели межлокусных взаимодействий, соответствующие следующим критериям: 2-х локусные модели - $p < 1,78 \cdot 10^{-3}$ ($< 0,05/28$), 3-х локусные модели - $p < 8,92 \cdot 10^{-4}$ ($< 0,05/56$). Для отобранных в соответствии с вышеуказанными критериями наиболее значимых моделей SNP×SNP взаимодействий, ассоциированных с бесплодием у женщин с генитальным эндометриозом, выполнялся пермутационный тест (проводилось 1000 пермутаций). Статистически значимым считали $p_{perm} \leq 0,005$. Отдельные комбинации полиморфизмов, связанные с риском развития бесплодия у женщин с генитальным эндометриозом определялись методом MB-MDR при $p < 0,05$.

Возможность использования предложенного способа для оценки прогнозирования риска развития бесплодия у женщин с генитальным эндометриозом подтверждает анализ результатов наблюдений 395 пациентов, 132 из которых - женщины с генитальным эндометриозом в сочетании с бесплодием, (средний возраст - 34,07 лет, SD=6,55) и 263 индивидуумы с генитальным эндометриозом без сопутствующего бесплодия (группа сравнения). Средний возраст группы сравнения составил 42,77 лет (SD=8,77). Изучаемые группы включали индивидуумов русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья РФ и не имеющих родства между собой. Всем женщинам проводилось комплексное клиническое, инструментальное и лабораторное обследование, включающее общеклинические (сбор жалоб, клинический анализ крови и мочи, биохимическое исследование крови и др.) и специальные методы исследования (гинекологическое обследование, забор мазков на онкоцитологическое исследование с области стыка многослойного плоского эпителия влагалищной части шейки матки и цилиндрического эпителия цервикального канала и исследование флоры цервикального канала и влагалищного содержимого, ультразвуковое сканирование органов малого таза и др). Все исследования проводились под контролем этического комитета медицинского факультета Белгородского государственного университета с информированного согласия пациенток на использование материалов лечебно-диагностических мероприятий, связанных с заболеванием, для научно-исследовательских целей и протоколировались по стандартам этического комитета Российской Федерации.

При изучении SNP x SNP взаимодействий установлена генетическая модель, включающая наличие значимой трёхлокусной модели, вовлеченную в формирование бесплодия у женщин с генитальным эндометриозом, является rs8023580 гена NR2F2 - rs10454142 гена PPP1R21 - rs17496332 гена PRMT6 ($p_{perm} \leq 0,001$). С развитием заболевания наиболее значимая ассоциация выявлена для комбинации полиморфизмов rs8023580 TT гена NR2F2 - rs10454142 TT гена PPP1R21 - rs17496332 AA гена PRMT6 ($\beta = 0,71$ $p = 0,042$), имеющая рисковую направленность.

В качестве примеров конкретного применения разработанного способа проведено генетическое обследование женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья РФ и не имеющих родства между собой: проведено генетическое исследование по полиморфизмам rs8023580 гена NR2F2, rs10454142 гена PPP1R21, rs17496332 гена PRMT6.

У пациентки Ю. была взята венозная кровь, проведено генотипирование ДНК-маркеров, при анализе вовлеченности полиморфизмов rs8023580 гена NR2F2, rs10454142 гена PPP1R21, rs17496332 гена PRMT6, была выявлена комбинация полиморфизмов rs8023580 ТТ гена NR2F2 - rs10454142 ТТ гена PPP1R21 - rs17496332 АА гена PRMT6, что позволило отнести пациентку в группу больных с повышенным риском развития бесплодия в сочетании с генитальным эндометриозом. Дальнейшее наблюдение подтвердило диагноз бесплодия у пациентки с генитальным эндометриозом.

У пациентки Р. была взята венозная кровь, проведено генотипирование ДНК-маркеров, при анализе вовлеченности полиморфизмов rs8023580 гена NR2F2, rs10454142 гена PPP1R21, rs17496332 гена PRMT6, была выявлена комбинация полиморфизмов rs8023580 ТС гена NR2F2 - rs10454142 ТТ гена PPP1R21 - rs17496332 АА гена PRMT6, что позволило отнести пациентку в группу пациентов с низким риском развития бесплодия в сочетании с генитальным эндометриозом. Дальнейшее наблюдение не подтвердило диагноз у пациентки.

У пациентки Т. была взята венозная кровь, проведено генотипирование ДНК-маркеров, при анализе вовлеченности полиморфизмов rs8023580 гена NR2F2, rs10454142 гена PPP1R21, rs17496332 гена PRMT6, была выявлена комбинация полиморфизмов rs8023580 ТТ гена NR2F2 - rs10454142 ТТ гена PPP1R21 - rs17496332 АГ гена PRMT6, что позволило отнести пациентку в группу больных с низким риском развития бесплодия в сочетании с генитальным эндометриозом. Дальнейшее наблюдение не подтвердило диагноз у пациентки.

Применение данного способа позволит на доклиническом этапе формировать среди женщин группы риска и своевременно реализовывать в этих группах необходимые лечебно-профилактические мероприятия по предупреждению развития бесплодия у женщин с генитальным эндометриозом.

(57) Формула изобретения

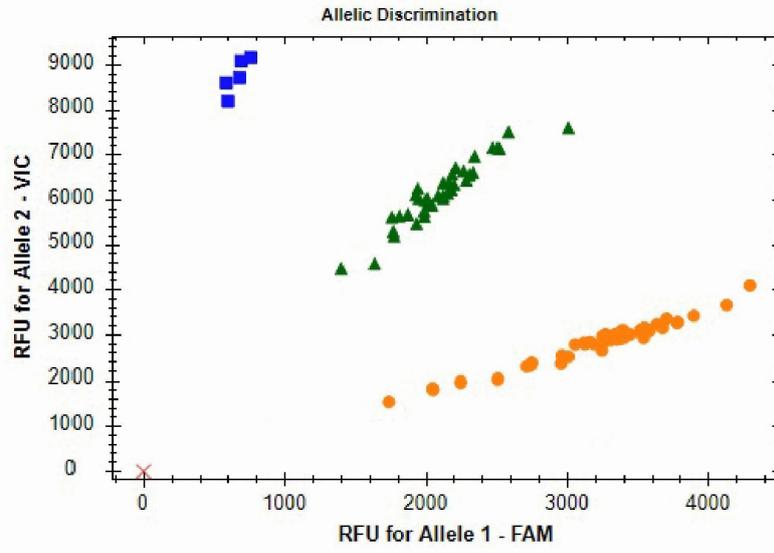
Способ прогнозирования риска развития бесплодия у женщин с генитальным эндометриозом, включающий выделение ДНК из периферической венозной крови и анализ полиморфизмов rs8023580 гена NR2F2, rs10454142 гена PPP1R21, rs17496332 гена PRMT6, при выявлении комбинации полиморфизмов rs8023580 ТТ гена NR2F2 - rs10454142 ТТ гена PPP1R21 - rs17496332 АА гена PRMT6 прогнозируют высокий риск развития бесплодия у женщин с генитальным эндометриозом.

35

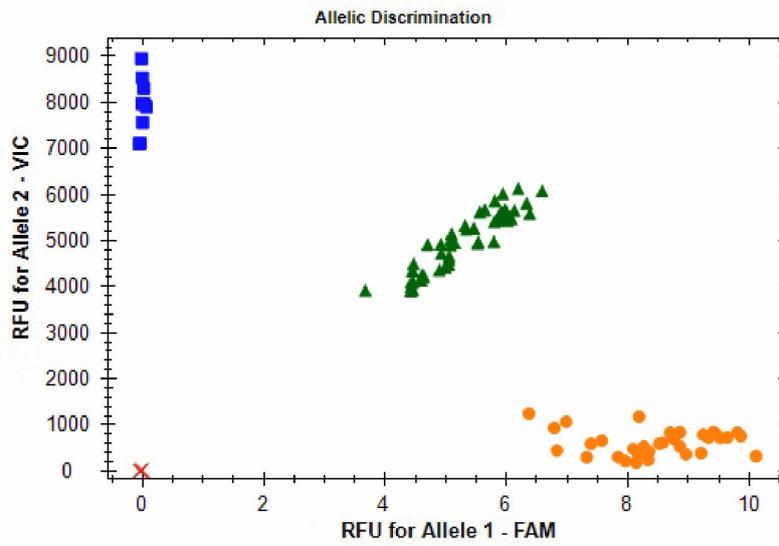
40

45

1

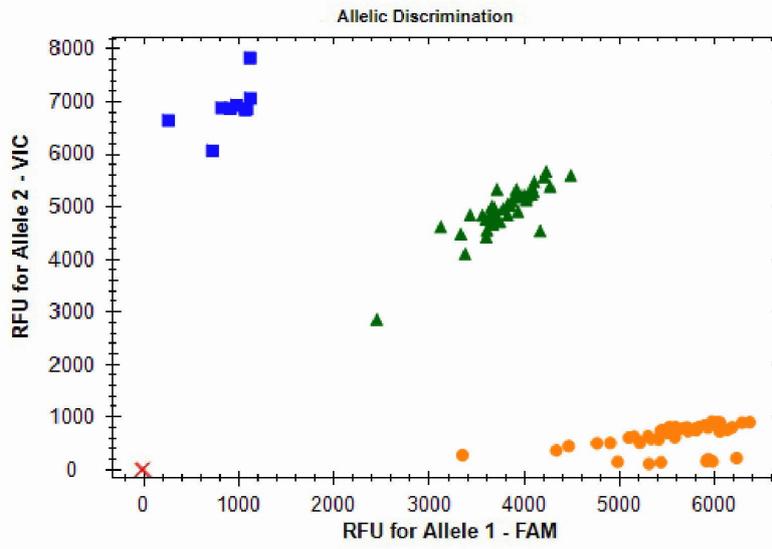


Фиг. 1



Фиг. 2

2



Фиг. 3