



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 2800/368 (2017.08); G01N 2800/50 (2017.08); G01N 33/50 (2017.08); C12Q 1/6804 (2017.08); C12Q 1/6827 (2017.08); C12Q 1/6844 (2017.08); C12Q 1/6858 (2017.08); C12Q 1/686 (2017.08); C12Q 2531/113 (2017.08); C12Q 2561/113 (2017.08); C12Q 2600/118 (2017.08); C12Q 2600/156 (2017.08)

(21)(22) Заявка: 2017115326, 02.05.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
02.05.2017Дата регистрации:
05.03.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 02.05.2017

(45) Опубликовано: 05.03.2018 Бюл. № 7

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),
Сиротина Светлана Сергеевна (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 2568893 C1, 20.11.2015. RU
2568891 C1, 20.11.2015. YI Y.C. et al. Matrix
metalloproteinase-7 (MMP-7) polymorphism
is a risk factor for endometrial cancer
susceptibility. Clin Chem Lab Med. 2010 Mar;
48(3): 337-344.

(54) Способ прогнозирования риска развития преэклампсии на основе комбинаций генов матриксных металлопротеиназ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицинской диагностики и предназначено для прогнозирования риска развития преэклампсии на основе комбинаций генов матриксных металлопротеиназ. Из периферической венозной крови женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья России, выделяют ДНК и проводят

анализ полиморфизмов генов. При выявлении сочетания аллеля С MMP-8 (rs11225395) и генотипа GG MMP-7 (rs11568818) прогнозируют низкий риск развития преэклампсии. Изобретение обеспечивает получение критериев оценки риска развития преэклампсии на основе генов матриксных металлопротеиназ. 3 ил., 3 пр.

RU 2 646 448 C 1

RU 2 646 448 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 2800/368 (2017.08); *G01N 2800/50* (2017.08); *G01N 33/50* (2017.08); *C12Q 1/6804* (2017.08); *C12Q 1/6827* (2017.08); *C12Q 1/6844* (2017.08); *C12Q 1/6858* (2017.08); *C12Q 1/686* (2017.08); *C12Q 2531/113* (2017.08); *C12Q 2561/113* (2017.08); *C12Q 2600/118* (2017.08); *C12Q 2600/156* (2017.08)

(21)(22) Application: **2017115326, 02.05.2017**

(24) Effective date for property rights:
02.05.2017

Registration date:
05.03.2018

Priority:

(22) Date of filing: **02.05.2017**

(45) Date of publication: **05.03.2018** Bull. № 7

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

(72) Inventor(s):

**Sirotina Svetlana Sergeevna (RU),
Polonikov Aleksej Valerevich (RU),
Dobrodomova Irina Sergeevna (RU),
Zarudskaya Oksana Miroslavovna (RU),
Akulova Lyudmila Yurevna (RU),
Ovcharova Veronika Sergeevna (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 PREDICTION OF RISK OF PREECLAMPSIA DEVELOPMENT BASED ON MATRIX METAL PROTEINASE GENES COMBINATIONS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: DNA is recovered from peripheral venous blood of Russian patients born in Central Black Earth of the Russian Federation, and gene polymorphisms are analysed. When a combination of C MMP-8 (rs11225395) allele and GG MMP-7

(rs11568818) genotype is detected, a low risk of pre-eclampsia is predicted.

EFFECT: obtaining of criteria to assess the risk of preeclampsia development based on matrix metal proteinase genes.

3 dwg, 3 ex

C 1
2 6 4 6 4 4 8
R U

R U
2 6 4 6 4 4 8
C 1

Изобретение относится к области медицинской диагностики, может быть использовано в акушерстве и гинекологии для прогнозирования риска развития преэклампсии на основе генов матриксных металлопротеиназ.

Преэклампсия (далее ПЭ) – 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].

ПЭ характеризуется следующими типичными клиническими симптомами: артериальной гипертензией, протеинурией, отеками, а также глубокими расстройствами функции сосудистой системы, гемостаза, иммунитета, гемодинамики и микроциркуляции, фетоплацентарной недостаточностью, нарушением функции почек, печени, легких.

По данным статистических исследований, частота ПЭ практически не снижается на протяжении последних двадцати лет и в Российской Федерации варьируется по разным территориям от 17,8% до 22,2% [Радзинский, В.Е. Проблемы гестоза и подходы к ее решению [Текст]. / В.Е. Радзинский, Т.В. Галина // Казанский медицинский журнал. – 2007. – Т. 88, № 2. – С. 114-117].

Согласно литературным данным к факторам риска развития данной патологии беременности относятся: ПЭ при предыдущей беременности, возраст, первая беременность, многоплодие, генетические факторы, социальные аспекты, профессиональные вредности, вредные привычки, неудовлетворительная экологическая обстановка, недостаточное и несбалансированное питание, осложненный акушерско-гинекологический анамнез, воспалительные заболевания гениталий, которые, как правило, сочетаются с поражением мочевыводящих путей, патология сосудистой системы [Risk factors for a prolonged length of stay in women hospitalized for preeclampsia in Texas / Z.D. Mulla, B.S. Nuwayhid, K.M. Garcia [et al.] [Text]. // Hypertens Pregnancy. 2010. Vol. 29, № 1. P. 54–68].

В настоящее время известно свыше 100 генов-кандидатов преэклампсии. Локальные генные сети преэклампсии включают гены метаболизма, гены эндотелиальной дисфункции, гены сосудистой системы, гены ростовых факторов и цитокинов, гены эндокринной системы, гены главного комплекса гистосовместимости [Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины [Текст]: Коллектив. моногр. / В. С. Баранов, А. С. Глотов, Т. Э. Иващенко и др.; под ред. В. С. Баранова. – Санкт-Петербург: Изд-во Н-Л, 2009. – 527 с.: ил.].

Согласно данным литературы матриксная металлопротеиназа-7 (ММР-7) является сильной протеиназой, которая гидролизует ряд белков матрикса, таких как фибронектин, ламинин, эластин, агрекан, коллаген V типа, и экспрессируется в эпителиальных клетках. Ген ММР-7 расположен на 11 хромосоме в положении 11q22.2. Наиболее изучены два функциональных полиморфизма гена ММР-7: (rs11568819) и (rs11568818), модулирующие транскрипцию путем взаимодействия с ядерными связывающими белками [Allele-specific regulation of matrix metalloproteinase-7 promoter activity is associated with coronary artery luminal dimensions among hypercholesterolemic patients [Text]. / S. Jormsjö, C. Whatling, D.H. Walter [et al.] // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2001. – Vol. 21, № 11. – P. 1834-1839].

Матриксная металлопротеиназа-8 (ММР-8) или нейтрофильная коллагеназа содержится в специфических гранулах полиморфноядерных лейкоцитов в виде неактивного профермента. Ген ММР-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].

Из области техники известен «Способ прогнозирования гестоза» по патенту РФ № 2191384 по заявке №2000115821/14, 16.06.2000. Заявляемый способ позволяет прогнозировать развитие гестоза за 2-4 недели до его клинических проявлений (артериальная гипертензия, протеинурия, отеки). Определяемое у беременных время устойчивости эритроцитов к перекисному гемолизу характеризует суммарный показатель состояния клеточных мембран.

Недостаток указанного способа заключается в том, что не рассматриваются генетические полиморфизмы и их сочетания с риском развития ПЭ.

За прототип выбран «Способ прогнозирования риска развития преэклампсии на основе комбинаций генов цитокинов» по патенту РФ №2568891, номер заявки 2014135181/15, 28.08.2014, включающий прогнозирование минимального риска развития преэклампсии при сочетании трех генетических вариантов четырех генетических полиморфизмов: G I-TAC (rs4512021) и +36 GG TNFR1; +250 A Lta, G I-TAC (rs4512021) и +36 GG TNFR1; +250 G Lta (rs909253), +36 A TNFR1 (rs767455), -403 G/A RANTES (rs2107538). Использование изобретения позволяет повысить эффективность выявления риска развития преэклампсии.

Задачей настоящего исследования является расширение арсенала способов диагностики, а именно создание способа прогнозирования риска развития преэклампсии на основе комбинаций генов матриксных металлопротеиназ.

Технический результат использования изобретения – получение критериев оценки риска развития преэклампсии на основе генов матриксных металлопротеиназ.

В соответствии с поставленной задачей был разработан способ прогнозирования риска развития преэклампсии на основе комбинаций генов матриксных металлопротеиназ у женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья России, включающий:

- выделение ДНК из периферической венозной крови;
- анализ полиморфизмов генов матриксных металлопротеиназ MMP-7 (rs11568818) и MMP-8 (rs11225395);

- прогнозирование риска развития преэклампсии при выявлении сочетания аллелей А MMP-7 (rs11568818) и Т MMP-8 (rs11225395);

- сочетание аллеля С MMP-8 (rs11225395) и генотипа GG MMP-7(rs11568818) является протективным фактором развития ПЭ.

Новизна и изобретательский уровень заключается в том, что из уровня техники не известна возможность прогноза развития преэклампсии по наличию сочетания генетических вариантов полиморфных локусов на основе комбинаций генов матриксных металлопротеиназ MMP-7 (rs11568818) и MMP-8 (rs11225395).

Выделение геномной ДНК из периферической крови осуществляют методом фенольно-хлороформной экстракции (Mathew, 1984) в два этапа. На первом этапе к 4 мл крови добавляют 25 мл лизирующего буфера, содержащего 320 мМ сахарозы, 1% тритон X-100, 5мМ MgCl₂, 10 мМ трис-НСl (рН=7,6). Полученную смесь перемешивают и центрифугируют при 4°С, 4000 об/мин в течение 20 минут. После центрифугирования

надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют 4 мл раствора, содержащего 25 mM ЭДТА (pH=8,0) и 75 mM NaCl, ресуспензируют. 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, деионизированной воде и хранят при -20°C. Выделенную ДНК используют для проведения полимеразной цепной реакции синтеза ДНК.

Для исследования полиморфизма MMP-7 (rs11568818) используют стандартные олигонуклеотидные праймеры и зонды [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] и наборы 2,5x реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ в объеме 25 мкл на 1 образец, включавших 2,5x реакционную смесь (2,5x ПЦР буфер: (KCl, ТрисHCl (pH 8,8), 6,25 mM MgCl₂), SynTaq ДНК-полимеразу, дезоксинуклеозидтрифосфаты, глицерол, Tween 20) в объеме 10 мкл, 25 mM MgCl₂ в объеме 1,5 мкл, ddH₂O (деионизированная вода), по 10 пкмоль каждого праймера и по 5 пкмоль каждого зонда. При проведении ПЦР в амплификаторе с флуоресцентной детекцией (на амплификаторе CFX96) генотипирование осуществляют методом TaqMan зондов по данным величин ОЕФ (оптические единицы флуоресценции). Для MMP-7 (rs11568818) зонд с флуоресцентным красителем ROX соответствует аллелю А, зонд с красителем FAM – аллелю G .

Анализ полиморфизма гена MMP-8 (rs11225395) 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 MgCl₂, 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+54.0°C; денатурация – 15 с при t+95°C. При проведении ПЦР в амплификаторе с флуоресцентной детекцией (на амплификаторе CFX96) генотипирование осуществляют методом TaqMan зондов по данным величин ОЕФ (оптические единицы флуоресценции) каждого зонда. Для MMP-8 (rs11225395) зонд с флуоресцентным красителем ROX соответствует аллелю Т, зонд с красителем FAM – аллелю С.

Выделенную ДНК подвергают полимеразной цепной реакции с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров (фиг. 3).

Изобретение характеризуется чертежами.

Фиг 1. Дискриминации аллелей методом детекции TaqMan зондов по данным величин ОЕФ (оптические единицы флуоресценции) каждого зонда на амплификаторе CFX96 с детектирующей системой в режиме реального времени полиморфизма MMP-7 (rs11568818), где ● - гомозигота GG MMP-7 (rs11568818), ■ - гомозигота AA MMP-7

(rs11568818), ▲ - гетерозигота GA MMP-7 (rs11568818), × - отрицательный контроль.

Фиг. 2. Дискриминации аллелей методом детекции TaqMan зондов по данным величин ОЕФ (оптические единицы флуоресценции) каждого зонда на амплификаторе CFX96 с детектирующей системой в режиме реального времени полиморфизма MMP-8 (rs11225395), где ● - гомозигота CC MMP-8 (rs11225395), ■ - гомозигота TT MMP-8 (rs11225395), ▲ - гетерозигота CT MMP-8 (rs11225395), × - отрицательный контроль).

Фиг. 3. Распространенность сочетаний некоторых аллелей/генотипов матриксных металлопротеиназ у женщин с ПЭ и в контрольной группе.

Анализ ассоциаций сочетаний генетических вариантов с преэклампсией проведен с помощью программного обеспечения APSampler (<http://sources.redhat.com/cygwin/>), использующего метод Монте-Карло марковских цепей и байесовскую непараметрическую статистику.

Статистическая обработка данных проводилась на персональном компьютере с использованием программных пакетов «STATISTICA for Windows 6.0» и «Microsoft Excel 2002».

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 варьировался от 17 до 45 лет и в среднем составил $27,74 \pm 5,4$ 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.

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, связанной с ПЭ, для научно-исследовательских целей и протоколировались по стандартам 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 марковских цепей 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» женщин с преэклампсией на основе комбинаций генов матриксных металлопротеиназ (Фиг. 3).

Установлено, что протективным фактором развития ПЭ является сочетание аллеля C MMP-8 (rs11225395) и генотипа GG MMP-7 (rs11568818), зарегистрированное у 13,57% беременных с ПЭ и у 19,96% женщин контрольной группы ($pf=0,005$, $pperm=0,02$ OR=0,62, 95% CI 0,45-0,89).

Примеры конкретного применения.

1. У беременной З., русской национальности, уроженки Центрального Черноземья, была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров было выявлено сочетание двух генетических вариантов C MMP-8 (rs11225395) и GG MMP-7(rs11568818), что позволило отнести ее в группу женщин с пониженным риском развития преэклампсии. Это подтвердило дальнейшее наблюдение. В течение беременности у

нее не было выявлено признаков ПЭ.

2. У женщины В., русской национальности, уроженки Центрального Черноземья, при прегравидарной подготовке была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК–маркеров было выявлено сочетание двух генетических вариантов С MMP-8 (rs11225395) и генотипа GG MMP-7(rs11568818), что позволило отнести ее в группу 5 женщин с пониженным риском развития преэклампсии. Это подтвердило дальнейшее наблюдение. При возникновении беременности у нее не было выявлено признаков ПЭ.

3. У беременной С., русской национальности, уроженки Центрального Черноземья, была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК–маркеров было выявлено 10 сочетание аллелей А MMP-7 (rs11568818) и Т MMP-8 (rs1320632). При дальнейшем наблюдении у нее была диагностирована преэклампсия.

Применение данного способа позволит выявлять при прегравидарной подготовке и на ранних сроках беременности женщин, не входящих в группы риска.

15 (57) Формула изобретения

Способ прогнозирования риска развития преэклампсии на основе комбинаций генов матриксных металлопротеиназ у женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья России, включающий выделение ДНК из периферической венозной крови, анализ полиморфизмов генов матриксных 20 металлопротеиназ MMP-7 (rs11568818) и MMP-8 (rs11225395), прогноз низкого риска развития преэклампсии при выявлении сочетания аллеля С MMP-8 (rs11225395) и генотипа GG MMP-7 (rs11568818).

25

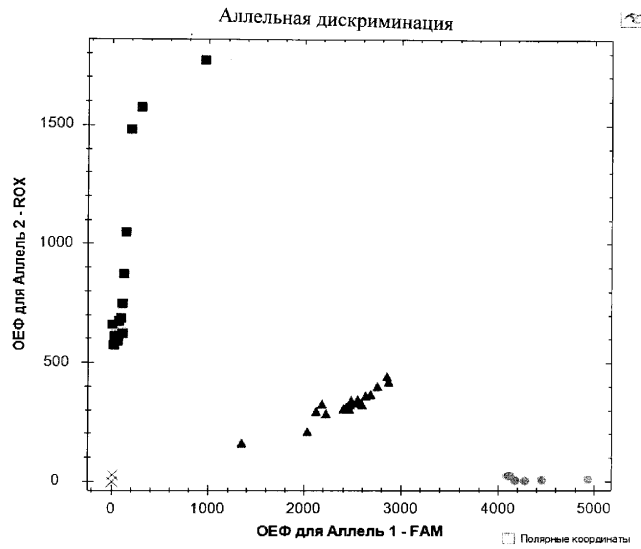
30

35

40

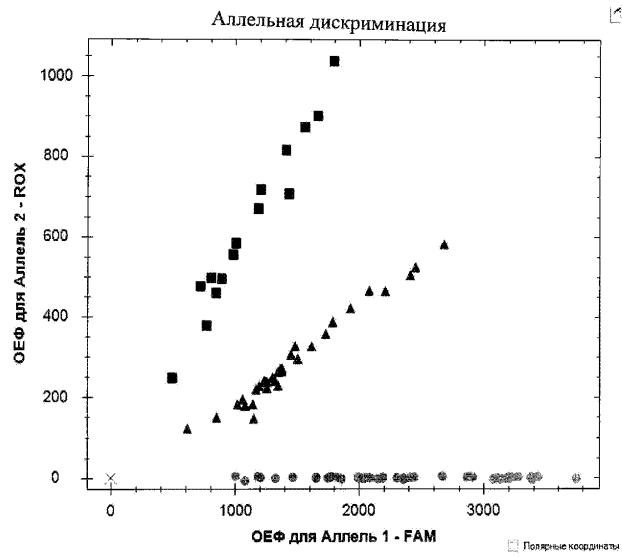
45

Способ прогнозирования риска развития преэклампсии
на основе комбинаций генов матриксных металлопротеиназ



Фиг. 1

Способ прогнозирования риска развития преэклампсии
на основе комбинаций генов матриксных металлопротеиназ



Фиг. 2

Способ прогнозирования риска развития преэклампсии
на основе комбинаций генов матриксных металлопротеиназ

Распространенность сочетаний некоторых аллелей/генотипов матриксных металлопротеиназ у женщин с ПЭ и в контрольной группе						
Сочетание (аллели/генотипы)	Беременные с ПЭ (n=468)		Беременные без ПЭ (n=577)		P _f (P _{perm})	OR (95% CI)
	n/N	%	n/N	%		
A MMP-7 (rs11568818) T MMP-8 (rs11225395)	249/442	56,33	261/546	47,80	0,005 (0,02)	1,41 1,09-1,81
C MMP-8 (rs11225395) GG MMP7 (rs11568818)	60/442	13,57	109/546	19,96	0,005 (0,02)	0,62 0,45-0,89

Фиг. 3