



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: 2016151614, 27.12.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
27.12.2016Дата регистрации:  
05.03.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 27.12.2016

(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)

(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. RU 2568892 C1,  
20.11.2015. SU L. et al. Genotypes and  
haplotypes of matrix metalloproteinase 1, 3 and  
12 genes and the risk of lung cancer.  
Carcinogenesis. 2006 May; 27(5): 1024-9. Epub  
2005 Nov 25. DJURIC T. Association of MMP-  
8 promoter gene polymorphisms with carotid  
atherosclerosis: (см. прод.)

(54) Способ прогнозирования риска развития преэклампсии у женщин в зависимости от наследственной отягощенности

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины, в частности к акушерству, и предназначено для прогнозирования риска развития преэклампсии. Из периферической венозной крови женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья России, выделяют ДНК и проводят анализ полиморфизмов генов цитокинов MMP-3, MMP-8 и MMP-12. Минимальный риск развития преэклампсии у женщин с наследственной

отягощенностью прогнозируют при выявлении сочетания аллелей А MMP-8 (rs11225395), С MMP-8 (rs1320632), А MMP-12 (rs652438), а у женщин без наследственной отягощенности - при выявлении сочетания аллелей 6А MMP-3 (rs3025058), А MMP-8 (rs11225395), С MMP-8 (rs1320632). Изобретение обеспечивает получение критериев оценки риска развития преэклампсии у женщин с отягощенной и неотягощенной наследственностью. 4 ил., 8 пр.

(56) (продолжение):

preliminary study. Atherosclerosis. 2011 Dec; 219(2): 673-8. Epub 2011 Aug 22.

R U 2 6 4 6 4 5 5 C 1

R U 2 6 4 6 4 5 5 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: **2016151614, 27.12.2016**(24) Effective date for property rights:  
**27.12.2016**Registration date:  
**05.03.2018**

Priority:

(22) Date of filing: **27.12.2016**(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):

**Polonikov Aleksej Valerevich (RU),  
Churnosov Mikhail Ivanovich (RU),  
Ovcharova Veronika Sergeevna (RU),  
Akulova Lyudmila Yurevna (RU),  
Zarudskaya Oksana Miroslavovna (RU),  
Dobrodomova Irina Sergeevna (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 IN WOMEN DEPENDING ON HEREDITARY BURDEN**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: DNA is extracted from peripheral venous blood of Russian women born in the Central Chernozem Region of Russia and the polymorphisms of cytokine genes MMP-3, MMP-8 and MMP-12 are analyzed. The minimal risk of preeclampsia development in women with hereditary burden is predicted when a combination of A MMP-8 (rs11225395), C MMP-8 (rs1320632), A MMP-12

(rs652438) alleles is detected, and without hereditary burden, when a combination of 6A MMP-3 (rs3025058), A MMP-8 (rs11225395), C MMP-8 (rs1320632) alleles is detected.

EFFECT: obtaining of assesment criteria for the risk of pre-eclampsia development in women with burdened and not burdened heredity.

4 dwg, 8 ex

RU 2 646 455 C 1

RU 2 646 455 C 1

Изобретение относится к области медицинской диагностики, может быть использовано в акушерстве для прогнозирования осложнений беременности, а именно риска развития преэклампсии (ПЭ), у женщин по генетическим данным.

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].

В настоящее время ПЭ 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. 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 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.

В настоящее время многие исследователи рассматривают ПЭ как острую патологию эндотелия - генерализованное поражение эндотелия сосудов или эндотелиальную дисфункцию, приводящую к нарушению сосудистого тонуса, сосудистой проницаемости, баланса между тромбогенным потенциалом сосудистой стенки и ее тромборезистентностью [Киселева, Н. И. Маркеры дисфункции эндотелия при гестозе [Текст] / Н. И. Киселева, С. Н. Занько, А. П. Солодков // Дисфункция эндотелия: эксперим. и клинич. 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; Марков, Х. М. Молекулярные механизмы дисфункции сосудистого эндотелия [Текст] / Х. М. Марков // Кардиология. – 2005. – Т. 45, № 12. – С. 62-72; Шифман, Е. М. Преэклампсия, эклампсия, HELLP-синдром [Текст] / Е. М. Шифман; Респ. перинат. центр М-ва здравоохранения Респ. Карелия. – Петрозаводск: ИнтелТек, 2002. – 432 с.].

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.].

Матриксная металлопротеиназа-3 – протеолитический фермент, субстратом активности для которого являются протеогликаны, ламинин, фибронектин, нефибриллярные коллагены [Молекулярно-генетические факторы прогноза гладкомышечных новообразований матки: роль матриксных металлопротеиназ [Текст] / А. А. Должиков, М. И. Чурносоев, С. П. Пахомов [и др.] // Человек и его здоровье: Курск. науч.-практ. вестн. – 2012. – № 2. – С. 138-146]. Ген MMP-3 локализован на 11 хромосоме в положении 11q22.3. Полиморфизм гена MMP-3 идентифицирован в 1672 положении от начала транскрипции [Yamada Y., 2006; Zachariah, J.P. et al., 2012].

Однонуклеотидная замена MMP-3 (rs3025058), содержащая 5 или 6 остатков аденозина, находится в промоторной области MMP-3. 6А аллель ассоциирована со снижением экспрессии MMP-3 и повышением уровня коллагена во внеклеточном матриксе [Yamada, Y. Identification of genetic factors and development of genetic risk diagnosis systems for cardiovascular diseases and stroke [Text] / Y. Yamada // *Circ. J.* – 2006. – Vol. 70, № 10. – P. 1240-1248]. Имеются данные об ассоциации данного полиморфизма с развитием злокачественных новообразований, хронического пародонтита, ишемического инсульта, ревматоидного и коленного артрита и т.д. [Renin angiotensin aldosterone system and glycemia in pregnancy [Text] / Y. P. Chen, J. Li, Z. N. Wang [et al.] // *Clin. Lab.* – 2012. – Vol. 58, № 5-6. – P. 527-533].

Матриксная металлопротеиназа-8 (MMP-8) или нейтрофильная коллагеназа содержится в специфических гранулах полиморфно-ядерных 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-12 (MMP-12) – металлоэластаза, обнаруженная в макрофагах и активно гидролизующая эластин, коллаген IV типа, протеогликаны, а также различные компоненты внеклеточного матрикса [Stimulation of matrix metalloproteinases by tumor necrosis factor- $\beta$  in human pulp cell cultures [Text] / E. M. Rhim, S. J. Ahn, J. Y. Kim [et al.] // *J. Endod.* – 2013. – Vol. 39, № 6. – P. 795-800]. Ген матриксной металлопротеиназы-12 является частью кластера генов MMP, которые локализованы в хромосоме 11q22.3 и кодируют фермент MMP-12. Наиболее клинически значимым полиморфизмом является MMP-12 (rs2276109). Аллель А полиморфизма MMP-12 повышает сродство к фактору транскрипции AP-1 (activator protein-1) и, тем самым, обеспечивает более высокую экспрессию гена. Выявлена ассоциация данного полиморфного варианта с развитием ишемической болезни сердца, рака, эндометриоза [Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinase 12 and 13 genes are implicated in endometriosis progression [Text] / B. Borghese, J. D. Chiche, D. Vernerey [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2008. – Vol. 23, № 7. – P. 1207-1213], варикозной болезни нижних конечностей, фиброза легких и других постхимиолучевых легочных повреждений у больных раком молочной железы [Хурани, И. Ф. Генетические предпосылки развития постхимиолучевых легочных повреждений и пути их профилактики у больных раком молочной железы [Текст] / И. Ф. Хурани // *Злокачественные опухоли.* – 2015. – № 1 (12). – С. 3-8].

В изученной научно-медицинской и доступной патентной литературе авторами не было обнаружено способа прогнозирования риска развития преэклампсии у женщин с отягощенной и неотягощенной наследственностью на основе данных о полиморфизме генов матриксных металлопротеиназ MMP-3 (rs3025058), MMP-8 (rs1320632), MMP-8 (rs11225395), MMP-12 (rs652438).

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. Где 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,  $\gamma$ -бутиролактона и/или оксолан-3-она, 2-оксвалериановой кислоты и/или оксометилбутановой кислоты, ацетоуксусной кислоты, гексадецилоилэйкозатетраеноил-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 описании к патенту РФ № 2538661 по заявке 2011125546 (дата публикации патента 10.01.2015) прогноз повышенного риска развития преэклампсии осуществляют на основании того, что концентрация H2-релаксина, полученного из организма беременной женщины до проявления симптома преэклампсии, меньше предельного значения нижнего квартиля концентрации, равной примерно 500 пг/мл, характерной для беременной женщины. При этом концентрацию H2-релаксина измеряют с использованием антитела к H2-релаксину с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Кроме того, дополнительно измеряют концентрацию C-реактивного белка (CRP) в биологическом образце и определяют, что беременная женщина имеет повышенный риск развития преэклампсии, если концентрация CRP больше чем примерно 13,5 мкг/мл или меньше чем 1,5 мкг/мл, даже если концентрация H2-релаксина больше чем примерно 500 пг/мл.

В патенте РФ № 2481578 по заявке № 2012107573/15, 28.02.2012, опубликованном 10.05.2013, раскрыт способ прогнозирования развития тяжелой преэклампсии с помощью анализа крови, отличающийся тем, что у беременной во втором триместре рассчитывают лейкоцитарный индекс интоксикации и при его значении выше 1,6 прогнозируют развитие тяжелой преэклампсии.

Общий недостаток указанных способов заключается в том, что не рассматриваются генетические полиморфизмы и их сочетания с риском развития преэклампсии у женщин с отягощенной и неотягощенной наследственностью.

За прототип выбран «Способ прогнозирования риска развития преэклампсии у женщин с неотягощенной наследственностью» по патенту РФ № 2568893 по заявке № 2014135901/15, 04.09.2014. Заявляемый способ позволяет прогнозировать риск развития преэклампсии у женщин русской национальности, уроженок Центрального Черноземья, с неотягощенной наследственностью, выделяют ДНК из периферической крови и проводят анализ полиморфизмов генов цитокинов. Прогнозируют минимальный риск развития преэклампсии у женщин с неотягощенной наследственностью по шести сочетаниям генетических вариантов семи генетических полиморфизмов: +1931 A MIP1 $\beta$ , +250 A Lt6, -403 G/A RANTES; -801 G SDF1, G MCP-1, +250 A Lt6; -801 G SDF1, +250 A Lt6, G I-TAC; +250 A Lt6, G I-TAC, -308 GG TNF6; +1931 A MIP1 $\beta$ , -403 A RANTES; -801 G SDF1, G MCP-1.

Задачей настоящего исследования является расширение арсенала способов

диагностики, а именно создание способа прогнозирования риска развития ПЭ у женщин по данным о генетических полиморфизмах MMP-3 (rs3025058), MMP-8 (rs1320632), MMP-8 (rs11225395), MMP-12 (rs652438).

5 Технический результат использования изобретения – получение критериев оценки риска развития преэклампсии у женщин с отягощенной и неотягощенной наследственностью.

В соответствии с поставленной задачей был разработан способ прогнозирования преэклампсии у женщин с отягощенной и неотягощенной наследственностью, русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья России, 10 включающий:

- выделение ДНК из периферической венозной крови;
- анализ полиморфизмов генов цитокинов MMP-3 (rs3025058), MMP-8 (rs1320632), MMP-8 (rs11225395), MMP-12 (rs652438);
- прогнозирование минимального риска развития преэклампсии у женщин с 15 наследственной отягощенностью при выявлении сочетания аллелей А MMP-8 (rs11225395), С MMP-8 (rs1320632), А MMP-12 (rs652438);
- прогнозирование минимального риска развития преэклампсии у женщин без наследственной отягощённости при выявлении сочетания аллелей 6А MMP-3 (rs3025058), А MMP-8 (rs11225395), С MMP-8 (rs1320632).

20 Новизна и изобретательский уровень заключается в том, что из уровня техники беременных не известна возможность прогноза развития преэклампсии у женщин с отягощенной и неотягощенной наследственностью по наличию различных сочетаний генетических вариантов полиморфных локусов MMP-3 (rs3025058), MMP-8 (rs1320632), MMP-8 (rs11225395), MMP-12 (rs652438).

25 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 320 мМ сахарозы, 1% тритон X-100, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ трис-НСl (рН=7,6). Полученную 30 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 мМ ЭДТА (рН=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°С в течение 16 часов.

35 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 -200°С.

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

Изобретение характеризуется следующими графическими материалами:

45 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 MMP-3 (rs3025058) (● - гомозигота 5G MMP-3 (rs3025058), ■ - гомозигота 6G MMP-3 (rs3025058), ▲ - гетерозигота 5G/6G MMP-3 (rs3025058), ✕ - 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 MMP-8 (rs1320632) (● - гомозигота AA MMP-8 (rs1320632), ■ - гомозигота GG MMP-8 (rs1320632), ▲ - гетерозигота AG MMP-8 (rs1320632), ✕ - отрицательный контроль).

5 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 MMP-8 (rs11225395) (● - гомозигота CC MMP-8 (rs11225395), ■ - гомозигота TT MMP-8 (rs11225395), ▲ - гетерозигота CT MMP-8 (rs11225395), ✕ - отрицательный контроль).

10 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 MMP-12 (rs652438) (● - гомозигота AA MMP-12 (rs652438), ■ - гомозигота GG MMP-12 (rs652438), ▲ - гетерозигота AG MMP-12 (rs652438), ✕ - отрицательный контроль).

15 Анализ полиморфизма гена MMP-3 (rs3025058) проводят методом ПЦР синтеза ДНК на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad) с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров и зондов [Matrix metalloproteinase release from placental explants of pregnancies complicated by intrauterine growth restriction [Text] / S. J. Merchant, I. P. Crocker, P. N. Baker [et al.] // J. Soc. Gynecol. Investig. – 2004. – Vol. 11, № 2. – P. 97-  
20 103] с последующим анализом полиморфизма методом дискриминации аллелей. Реакционная смесь объемом 25 мкл включает: 67 мМ трис-НСl (рН=8,8), 2,5 мМ 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  
25 денатурации (5 мин при 95°C) выполняют 40 циклов амплификации по схеме: отжиг праймеров – 1 мин при t +55.7°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 RFU (уровень относительной флуоресценции) каждого зонда. Для MMP-3 (rs3025058) зонд с флуоресцентным красителем ROX соответствует аллелю 5А, зонд с красителем FAM  
30 – аллелю 6А (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  
35 включает: 67 мМ трис-НСl (рН=8,8), 2,5 мМ 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 (Фиг. 2); денатурация – 15 с при t +95°C для MMP-8 (rs11225395) (Фиг. 3).

45 Для исследования полиморфизма MMP-12 (rs652438) используют наборы реагентов “SNP-Скрин” для определения однонуклеотидных полиморфизмов ДНК человека методом ПЦР-РВ №104 MMP12 Asn356Ser. [Каталожный номер NP-530-100, ООО «Синтол». Интернет-ссылка: <http://syntol.ru/>], включающие 2,5х реакционную смесь (10 мкл на реакцию), 2,5х разбавитель (10 мкл на реакцию), Taq ДНК-полимеразу (0,5 мкл



на реакцию) и контрольные образцы каждого зонда. После денатурации (3 мин при 95°C) выполняют 40 циклов амплификации по схеме: отжиг праймеров – 0,40 мин при  $t + 63.0^{\circ}\text{C}$ , денатурация – 15 с при  $t + 95^{\circ}\text{C}$  (Фиг. 4).

5 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 10 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 проведены на базе Перинатального центра Белгородской областной клинической больницы с 15 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 марковскими цепями и байесовскую непараметрическую статистику [A Gibbs sampler for identification of 20 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

25 Выявлено, что сочетание А MMP-8 (rs11225395), С MMP-8 (rs1320632), А MMP-12 (rs652438) зарегистрировано у 70,30% беременных с ПЭ с наследственной отягощенностью, что в 1,2 раза меньше аналогичного показателя контрольной группы (84,45%,  $p_f = 0,0008$ ,  $p_{perm} = 0,003$  OR=0,44, 95% CI 0,27-0,71). Сочетание аллелей 6А MMP-3 (rs3025058), А MMP-8 (rs11225395), С MMP-8 (rs1320632) у беременных без 30 наследственной отягощённости встречается у 47,78%, в то время как в контрольной группе их распространенность равна 66,05% ( $p_f = 0,0007$ ,  $p_{perm} = 0,0002$ , OR=0,47, 95% CI 0,30-0,74). Вышеуказанные комбинации оказывают протективное значение для формирования преэклампсии у женщин с наследственной отягощенностью и без 35 наследственной отягощенности.

Итак, резюмируя полученные данные, можно сделать вывод, что четыре генетических полиморфизма матриксных металлопротеиназ формируют две комбинации генетических вариантов, определяющих минимальный риск развития ПЭ у женщин с отягощенной и неотягощенной наследственностью: А MMP-8 (rs11225395), С MMP-8 (rs1320632), А 40 MMP-12 (rs652438) и 6А MMP-3 (rs3025058), А MMP-8 (rs11225395), С MMP-8 (rs1320632) соответственно. Данные комбинации снижают риск развития ПЭ у женщин с отягощенной и неотягощенной наследственностью.

Примеры конкретного выполнения.

1. У беременной С. с отягощенной наследственностью, русской национальности, уроженки Центрального Черноземья, была взята венозная кровь, при генотипировании 45 ДНК-маркеров было выявлено сочетание трех генетических вариантов А MMP-8 (rs11225395), С MMP-8 (rs1320632), А MMP-12 (rs652438), что позволило отнести ее в группу беременных с пониженным риском развития ПЭ. Это подтвердило дальнейшее наблюдение. В течение беременности у нее не было выявлено признаков ПЭ.

2. У беременной М. с отягощенной наследственностью, русской национальности, уроженки Центрального Черноземья, была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК–маркеров было выявлено сочетание трех генетических вариантов G MMP-8 (rs11225395), T MMP-8 (rs1320632), G MMP-12 (rs652438), что позволило отнести ее в группу беременных с повышенным риском развития ПЭ. Это подтвердило дальнейшее наблюдение. В течение беременности у нее была диагностирована преэклампсия.

3. У женщины П. с отягощенной наследственностью, при прегравидарной подготовке, была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК–маркеров было выявлено сочетание A MMP-8 (rs11225395), C MMP-8 (rs1320632), A MMP-12 (rs652438), что позволило отнести ее в группу беременных с пониженным риском развития ПЭ. Это подтвердило дальнейшее наблюдение. При возникновении беременности у нее не было выявлено признаков преэклампсии.

4. У беременной П. с отягощенной наследственностью, русской национальности, уроженки Центрального Черноземья, была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК–маркеров было выявлено сочетание трех генетических вариантов G MMP-8 (rs11225395), T MMP-8 (rs1320632), G MMP-12 (rs652438), что позволило отнести ее в группу беременных с повышенным риском развития ПЭ. Это подтвердило дальнейшее наблюдение. В течение беременности у нее была диагностирована преэклампсия.

5. У беременной О. без отягощенной наследственности, русской национальности, уроженки Центрального Черноземья, была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК–маркеров было выявлено сочетание трех генетических вариантов 6A MMP-3 (rs3025058), A MMP-8 (rs11225395), C MMP-8 (rs1320632), что позволило отнести ее в группу беременных с пониженным риском развития ПЭ. Это подтвердило дальнейшее наблюдение. У нее не были выявлены признаки ПЭ.

6. У беременной Л. без отягощенной наследственности, русской национальности, уроженки Центрального Черноземья, была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК–маркеров было выявлено сочетание трех генетических вариантов 5A MMP-3 (rs3025058), G MMP-8 (rs11225395), T MMP-8 (rs1320632), что позволило отнести ее в группу беременных с повышенным риском развития ПЭ. Это подтвердило дальнейшее наблюдение. У нее была диагностирована преэклампсия.

7. У женщины Г. без отягощенной наследственности, уроженки Центрального Черноземья, была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК–маркеров было выявлено сочетание трех генетических вариантов 6A MMP-3 (rs3025058), A MMP-8 (rs11225395), C MMP-8 (rs1320632), что позволило отнести ее в группу беременных с пониженным риском развития ПЭ. Это подтвердило дальнейшее наблюдение. При возникновении беременности у нее не было выявлено признаков ПЭ.

8. У беременной З. без отягощенной наследственности, русской национальности, уроженки Центрального Черноземья, была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК–маркеров было выявлено сочетание трех генетических вариантов 5A MMP-3 (rs3025058), G MMP-8 (rs11225395), T MMP-8 (rs1320632), что позволило отнести ее в группу беременных с повышенным риском развития ПЭ. Это подтвердило дальнейшее наблюдение. У нее была диагностирована преэклампсия.

#### (57) Формула изобретения

Способ прогнозирования риска развития преэклампсии у женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья России, с отягощенной и неотягощенной наследственностью, включающий выделение ДНК из периферической венозной крови, анализ полиморфизмов генов и прогнозирование

минимального риска развития преэклампсии, отличающийся тем, что проводят анализ полиморфизмов генов цитокинов MMP-3 (rs3025058), MMP-8 (rs1320632), MMP-8 (rs11225395), MMP-12 (rs652438) и прогнозируют минимальный риск развития преэклампсии у женщин с наследственной отягощенностью при выявлении сочетания аллелей А MMP-8 (rs11225395), С MMP-8 (rs1320632), А MMP-12 (rs652438), а у женщин без наследственной отягощенности - при выявлении сочетания аллелей 6А MMP-3 (rs3025058), А MMP-8 (rs11225395), С MMP-8 (rs1320632).

10

15

20

25

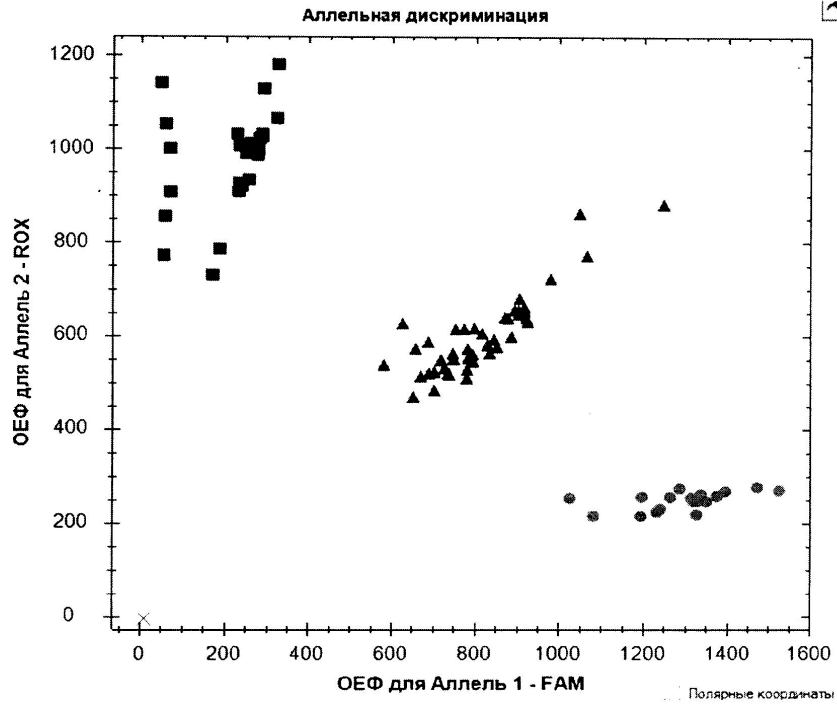
30

35

40

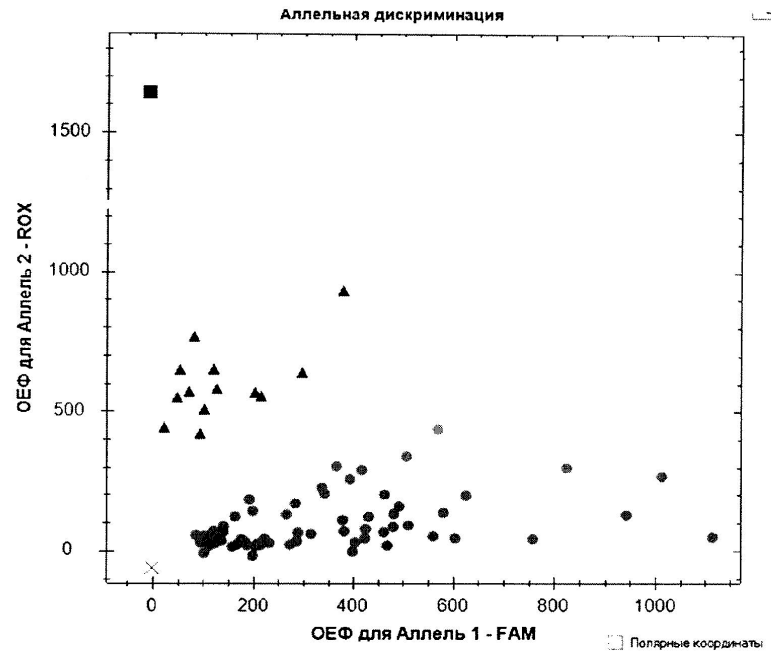
45

Способ прогнозирования риска развития преэклампсии  
у женщин в зависимости от наследственной отягощенности



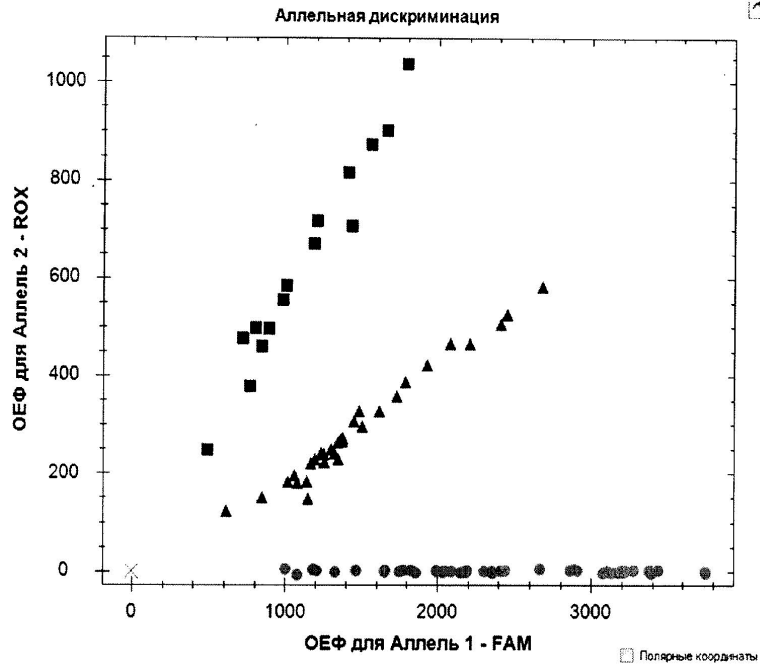
Фиг.1

Способ прогнозирования риска развития преэклампсии у женщин в зависимости от наследственной отягощенности



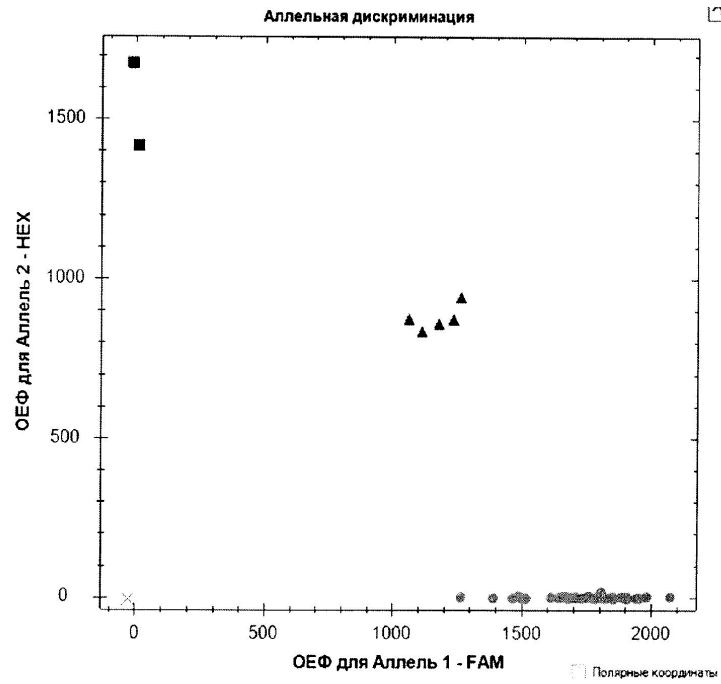
Фиг. 2

Способ прогнозирования риска развития преэклампсии у женщин в зависимости от наследственной отягощенности



Фиг. 3

Способ прогнозирования риска развития преэклампсии  
у женщин в зависимости от наследственной отягощенности



Фиг.4