



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12Q 1/6806 (2022.02); C12N 15/00 (2022.02)

(21)(22) Заявка: 2021112175, 28.04.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.04.2021

Дата регистрации:
22.04.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 28.04.2021

(45) Опубликовано: 22.04.2022 Бюл. № 12

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

Чурносов Михаил Иванович (RU),
Головченко Олег Васильевич (RU),
Абрамова Мария Юрьевна (RU),
Пономаренко Ирина Васильевна (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: Abd-Rabou A. A. R. S. Molecular
genetic studies in pregnancies affected by
preeclampsia and intrauterine growth restriction,
University of Nottingham, 2011, докторская
диссертация. А. Теремов, Р. Петросова,
Биология. Биологические системы и процессы,
стр. 22. Н.А. КУРНОСОВА, М.А.
СЕМЕНОВА, Основы генетики, Ульяновский
Государственный Университет, (см. прод.)

(54) Способ прогнозирования риска развития синдрома задержки роста плода у женщин с отягощенным семейным анамнезом

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Предложен способ прогнозирования риска развития синдрома задержки роста плода у беременных, являющихся уроженками Центрального Черноземья русской национальности, имеющих отягощенный

семейный анамнез по задержке роста плода. Данный способ включает выделение ДНК из периферической венозной крови и анализ полиморфизма гена эпидермального фактора роста (EGF). 1 ил., 1 табл., 4 пр.

(56) (продолжение):

Ульяновск 2014, стр.7-18. US 20140017677 16.01.14 A1. RU 2331365 C1 20.08.2008 C1.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11)**2 770 869**⁽¹³⁾ **C1**

(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
C12Q 1/6806 (2022.02); *C12N 15/00* (2022.02)

(21)(22) Application: **2021112175, 28.04.2021**(24) Effective date for property rights:
28.04.2021Registration date:
22.04.2022

Priority:

(22) Date of filing: **28.04.2021**(45) Date of publication: **22.04.2022** Bull. № 12

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

**Churnosov Mikhail Ivanovich (RU),
Golovchenko Oleg Vasilevich (RU),
Abramova Mariya Yurevna (RU),
Ponomarenko Irina Vasilevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Belgorodskij gosudarstvennyj
natsionalnyj issledovatel'skij universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**

(54) METHOD FOR PREDICTING THE RISK OF DEVELOPING FETAL GROWTH RETARDATION SYNDROME IN WOMEN WITH A BURDENED FAMILY HISTORY

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology. A method is proposed for predicting the risk of developing fetal growth retardation syndrome in pregnant women who are natives of the Central Chernozem region of Russian nationality and have an aggravated family history of fetal growth retardation.

This method includes isolation of DNA from peripheral venous blood and analysis of polymorphism of the epidermal growth factor (EGF) gene.

EFFECT: improvement of method for predicting the risk of developing fetal growth retardation syndrome in pregnant women.

1 cl, 1 dwg, 1 tbl, 1 ex

RU 2 770 869 C1

RU 2 770 869 C1

Изобретение относится к области медицинской диагностики, может быть использовано для прогнозирования риска развития синдрома задержки роста плода у женщин с отягощенным семейным анамнезом.

В структуре осложнений беременности значимое место занимает задержка роста плода (далее ЗРП) [Devaskar S.U., Chu A. Intrauterine growth restriction: hungry for an answer. *Physiology (Bethesda)*. 2016;31(2):131–46]. При недостаточном достижении плодом показателей массы и роста в соответствии с гестационным сроком с учетом пола и этнической принадлежности можно говорить о задержке роста плода [Intrauterine Growth Restriction: Antenatal and Postnatal Aspects [Text]. Sharma D, Shastri S, Sharma P. *Clinical Medicine Insights: Pediatrics*. 2016;10:67-83]. Среди всех беременностей встречаемость ЗРП может достигать 8-10%. ЗРП имеет неблагоприятные последствия как для перинатального периода (повышает риски асфиксии, аспирации меконием, респираторного дистресс-синдрома, и других заболеваний, а также смертности в этот период), так и для взрослого возраста (увеличивает риски возникновения сердечно-сосудистой патологии, метаболических расстройств и др. [Malhotra A., Allison B.J., Castillo-Melendez M. et al. Neonatal morbidities of fetal growth restriction: pathophysiology and impact. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:55].

ЗРП имеет гетерогенную природу и может являться результатом воздействия целого ряда различных факторов плацентарного (морфофункциональные и эпигенетические нарушения в плаценте и др.), плодного (генетически детерминированные дефекты) и материнского (заболевания сердца и сосудов, дефицит и дисбаланс питания, гипоксические воздействия, влияние токсических веществ и др.) происхождения. В настоящее время не вызывает сомнений значимая роль наследственных факторов среди причин ЗРП и в том числе генетических факторов материнского организма [Ефремова О.А. Изучение ассоциации полиморфных локусов генов фолатного цикла с развитием синдрома задержки роста плода 2-3 степени. Научные результаты биомедицинских исследований. 2020;6(1):37-50]. По современным данным вес новорожденного на 40% связан с наследственными факторами [Golovchenko O, Abramova M, Ponomarenko I, et al. Functionally significant polymorphisms of ESR1 and PGR and risk of intrauterine growth restriction in population of Central Russia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2020;253:52-57]. Однако следует отметить, что имеющиеся молекулярно-генетические исследования не дают однозначного ответа о роли конкретных полиморфных локусов различных групп генов в формировании ЗРП. Поэтому остается актуальным поиск генетических маркеров для ранней диагностики данного осложнения беременности.

Ген EGF (хромосомная локализация 4q25, HGNC ID: 3229) относится к суперсемейству генов эпидермальных факторов роста, а из кодируемого им препропротеина, вследствие протеолитической трансформации, образуется пептид - эпидермальный фактор роста (состоит из 53-аминокислот и имеет молекулярную массу 6,0 kD, OMIM 131530). Этот белок действует как мощный митогенный фактор, который играет важную роль в росте, пролиферации и дифференцировке многочисленных типов клеток (эктодермального и мезодермального происхождения). Биологические эффекты эпидермального фактора роста реализуются за счет его связывания со своим специфическим рецептором (рецептор эпидермального фактора роста, EGFR), расположенным на клеточной мембране [Zeng F, Harris RC. Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. *Semin Cell Dev Biol*. 2014;28:2-11]. Как митогенный фактор роста, EGF играет важную роль в развитии эмбриона уже с момента предимплантации [Wei Z, Park KW, Day BN, Prather RS. Effect of epidermal growth factor on preimplantation development and its receptor expression in porcine embryos. *Mol Reprod Dev*. 2001]. Было показано, что EGF способствует

предимплантационному росту эмбрионов, а также инвазии трофобластов и постимплантационному росту эмбрионов [Dadi TD, Li MW, Lloyd KC. EGF and TGF-alpha supplementation enhances development of cloned mouse embryos. Cloning Stem Cells. 2007;9: 315–326]. Исследований, направленных на изучение вовлеченности локуса rs4444903 гена EGF в формирование осложнений беременности в доступной литературе обнаружено не было.

В Российской Федерации исследования вовлеченности гена эпидермального фактора роста (EGF) в формирование предрасположенности к развитию синдрома задержки роста плода немногочисленны, а данные о роли полиморфного локуса rs4444903 гена EGF в формировании синдрома задержки роста плода у беременных с отягощенным семейным анамнезом отсутствуют.

В изученной научно-медицинской и доступной патентной литературе авторами не было обнаружено способа прогнозирования риска развития синдрома задержки роста плода у беременных, имеющих отягощенный семейный анамнез задержке роста плода, на основе данных о полиморфизме rs4444903 гена EGF.

Из области техники известен патент № 2646505 «Способ выявления наследственной предрасположенности к развитию задержки роста плода у курящих женщин» по заявке № 2017115003 от 27.04.2017. Способ представляет собой исследование периферической венозной крови, включающий выделение ДНК, проведение полимеразной цепной реакции и анализ полиморфизма генов женщин, отличающийся тем, что проводят анализ полиморфизма гена IL-10 G-1082A и при выявлении генотипов IL-10-1082A/A или IL-10-1082G/A делают вывод о наличии наследственной предрасположенности к задержке роста плода у курящих женщин. Недостатком указанного способа является возможность прогнозирования риска развития задержки роста плода только в ограниченной группе беременных, а именно, только у курящих женщин.

За прототип взят патент № 2540928 по заявке № 2013148878/15 от 31.10.2013 г. «Способ прогнозирования риска развития плацентарной недостаточности с синдромом задержки роста плода 2-3-ей степени у беременных», включающий забор периферической венозной крови, и отличающийся тем, что после выделения ДНК проводят анализ полиморфизмов генов факторов коагуляции 20210G/A FII, 1691G/A FV, 10976G/A FVII и прогнозируют повышенный риск развития плацентарной недостаточности с синдромом задержки роста плода 2-3-ей степени у беременных в случае выявления аллеля 10976G FVII и генотипа 10976GG FVII, а низкий риск прогнозируют при наличии следующих комбинаций: генотипа 20210GG FII и аллеля 10976A FVII; аллелей 20210G FII, 10976A FVII с генотипом 1691GG FV; аллелей 20210G FII и 10976A FVII. Методическая сложность: выделение ДНК и анализ нескольких генов факторов коагуляции. Для их изучения необходима современная генетическая лаборатория. Недостатками данного способа являются методическая сложность и многокомпонентность исследования. Кроме того, не проведены аналогичные аналитические исследования у женщин с плацентарной недостаточностью, но без формирования синдрома ЗРП.

Задачей настоящего исследования является расширение арсенала способов диагностики, а именно создание способа прогнозирования риска развития синдрома задержки роста плода у беременных русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья, и имеющих отягощенный семейный анамнез по задержке роста плода, на основе данных о полиморфном локусе rs4444903 гена эпидермального фактора роста EGF.

Технический результат использования изобретения – получение критериев оценки риска развития синдрома задержки роста плода у беременных, русской национальности,

являющихся уроженками Центрального Черноземья и имеющих отягощенный семейный анамнез по ЗРП, на основе данных о полиморфном локусе rs4444903 гена эпидермального фактора роста EGF, включающий:

- выделение ДНК из периферической венозной крови;
- анализ полиморфизма гена эпидермального фактора роста rs4444903 EGF;
- прогнозирование высокого риска развития синдрома задержки роста плода у

беременных с отягощенным семейным анамнезом по ЗРП при выявлении в генотипе аллеля G полиморфного локуса роста rs4444903 гена EGF.

Новизна и изобретательский уровень заключаются в том, что из уровня техники не известна возможность прогноза развития синдрома задержки роста плода у беременных, русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья и имеющих отягощенный семейный анамнез по ЗРП на основе данных о полиморфном локусе rs4444903 гена эпидермального фактора роста (EGF);

Выделение геномной ДНК из периферической крови осуществляют методом фенольно-хлороформной экстракции (Mathew, 1984) 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, 10 мМ трис-HCl (pH=7,6). Полученную смесь перемешивают и центрифугируют при 4°C, 4000 об/мин в течение 20 минут. После центрифугирования надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют 4 мл раствора, содержащего 25 мМ ЭДТА (pH=8,0) и 75 мМ NaCl, ресуспензируют. Затем прибавляют 0,4 мл 10% SDS, 35 мкл протеиназы К (10мг/мл) и инкубируют образец при 37°C в течение 16 часов.

На втором этапе из полученного лизата последовательно проводят экстракцию ДНК равными объемами фенола, фенол-хлороформа (1:1) и хлороформа с центрифугированием при 4000 об/мин в течение 10 минут. После каждого центрифугирования производят отбор водной фазы. ДНК осаждают из раствора двумя объемами охлажденного 96% этанола. После лиофилизации полученную ДНК растворяют в бидистиллированной, деионизованной воде и хранят при -20°C.

Выделенную ДНК используют для проведения полимеразной цепной реакции синтеза ДНК.

Анализ полиморфизма rs4444903 гена EGF проводят методом ПЦР-синтеза ДНК на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad) с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров и зондов с последующим анализом полиморфизма методом дискриминации аллелей. Реакционная смесь объемом 10 мкл включает: 67 мМ трис-HCl (pH=8,8), 2,5мМ 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 (2 мин при 95°C) выполняют 40 циклов амплификации по схеме: отжиг праймеров – 30 сек при t=60°C; денатурация – 10 сек при t=94°C. При проведении ПЦР в амплификаторе (CFX96) с флуоресцентной детекцией генотипирование осуществляют методом Tag Man зондов по данным величин ОЕФ (относительные единицы флуоресценции). Для rs4444903 EGF зонд с флуоресцентным красителем VIC соответствует аллелю А, зонд с красителем FAM – аллелю G (фиг.1).

Изобретение характеризуется фигурами.

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 ITGB3 (rs5918):

■ - AA, ● - GG, ▲ - AG, ◆ - отрицательный контроль.

Для анализа ассоциации изучаемого полиморфного локуса с риском развития

синдрома задержки роста плода у беременных сотягощенным семейным анамнезом по ЗРП проведен расчет показателей отношения шансов (ОШ) и их 95% доверительного интервала (95% ДИ). Вычисления выполнялись методом логистической регрессии в статистическом пакете программы PLINK (размещен на электронном ресурсе <http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/>) согласно четырех генетических моделей (аллельная, аддитивная, рецессивная, доминантная) с введением поправок на ковариаты (возраст и индекс массы тела женщины до беременности) и множественные сравнения (применялся адаптивный пермутационный тест). В качестве статистически значимого уровня использовали значение $p < 0,05$.

Возможность использования предложенного способа для оценки риска развития синдрома задержки роста плода у беременных с задержкой роста плода подтверждает анализ результатов наблюдений 196 беременных с ЗРП и 324 беременных контрольной группы. Показатели среднего возраста женщин с ЗРП ($26,63 \pm 4,41$ лет) и женщин контрольной группы с физиологическим течением гестации ($26,17 \pm 4,98$ лет) были сопоставимы ($p > 0,05$). Основанием для диагностики ЗРП являлось наличие несоответствия показателя расчетного веса плода (при отклонении более 10-го перцентиле) в сравнении с нормативным для данного возраста гестации. Оценка антропометрических характеристик новорожденного использовалась для подтверждения наличия ЗРП. Выборки для исследования формировались в профильных отделениях перинатального центра Белгородской ОКБ Святителя Иоасафа в период 2008–2015 гг. Основанием для включения в основную группу было наличие у беременной изолированной ЗРП, контрольная группа была сформирована из беременных с физиологической гестацией. Критерии исключения: срок гестации < 37 нед. и > 40 нед., многоплодная беременность, наличие другой патологии беременности (преэклампсия, аномалии прикрепления и расположения плаценты, наличие резус-конфликта), ВПР у плода, доброкачественные пролиферативные заболевания матки (миома матки) и ее аномалии развития, тяжелая соматическая патология, отказ женщины от участия в настоящем исследовании.

Настоящее исследование выполнено по стандартам надлежащей клинической практики и в соответствии с принципами Хельсинской декларации. Данная работа была одобрена этическим комитетом медицинского института НИУ БелГУ (протокол №2 от 13.02.2008) и выполнялась при письменном добровольном информированном согласии всех обследованных женщин.

Обследование беременных выполнялись на сроке родоразрешения и включало: общеклинический анализ крови и мочи, биохимический анализ крови, коагулограмму, определение уровня белка в суточной моче. Выполнялись КТГ, УЗИ плода, доплерометрия с оценкой кровотока в сосудах пуповины и матки. Для исследования использовался биохимический анализатор Architect c4000 (Abbotte, США). Ультразвуковая фетометрия проводилась на ультразвуковом аппарате экспертного класса TOSHIBA XARIO SSA-660A (Toshiba, Япония). При диагностике ЗРП осуществлялась оценка различий между полученными фетометрическими показателями и номограммами F. Hadlock. Соматометрия новорожденного проводилась стандартным методом.

Выявлено, что аллель G полиморфного локуса rs4444903 гена EGF ассоциирован с высоким риском развития задержки роста плода в рамках следующих генетических моделей взаимодействия аллелей: аддитивной (ОШ=1,33, 95%ДИ 1,02-1,75, $p=0,038$, $p_{perm}=0,039$, осуществлено 512 пермутационных процедур) и доминантной (ОШ=1,62, 95%ДИ 1,06-2,47, $p=0,026$, $p_{perm}=0,031$, проведено 655 пермутационных процедур).

Результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1

Локусы гены	Генотипы, минорные аллели	Частоты генетических вариантов (n)		Генетические модели ОШ (95 % ДИ)		
		Беременные с ЗРП (n = 196)	Контроль (n = 324)	Аддитивная	Доминантная	Рецессивная
rs4444903 <i>EGF</i>	A/A	0,217 (42)	0,306 (98)	1,33 (1,02-1,75) p=0,04	1,62 (1,06-2,47) p=0,03	1,28 (0,80-2,02) p=0,30
	A/G	0,576 (111)	0,522 (167)			
	G/G	0,207 (40)	0,172 (55)			
	Минорный аллель G	0,495	0,433			

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что аллельный вариант G полиморфного локуса rs4444903 гена EGF является фактором риска развития синдрома задержки роста плода у беременных с отягощенным семейным анамнезом по ЗРП.

Примеры конкретного выполнения

У беременной женщины К., уроженки Центрального Черноземья русской национальности, имеющей отягощенный семейный анамнез, на ранних сроках беременности была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров был выявлен аллель G в генотипе AG полиморфного локуса rs4444903 гена EGF, что позволило отнести ее в группу беременных с высоким риском развития СЗРП. Это подтвердило дальнейшее наблюдение: на сроке 30 недель установлен диагноз задержка роста плода I степени.

У беременной женщины Ж., уроженки Центрального Черноземья русской национальности, имеющей отягощенный семейный анамнез, на ранних сроках беременности была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров было выявлено отсутствие аллеля G, генотип AA, полиморфного локуса rs4444903 гена EGF, что позволило отнести ее в группу беременных с низким риском развития СЗРП. Это подтвердило дальнейшее наблюдение: в течение беременности и после родов не было выявлено признаков СЗРП.

У беременной женщины М., уроженки Центрального Черноземья русской национальности, имеющей отягощенный семейный анамнез, на этапе прегравидарной подготовки была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров был выявлен аллель G в генотипе GG полиморфного локуса rs4444903 гена EGF, что позволило отнести ее в группу беременных с высоким риском развития СЗРП. Это подтвердило дальнейшее наблюдение: при наступлении беременности на сроке 30 недель установлен диагноз задержка роста плода II степени.

У беременной женщины Д., уроженки Центрального Черноземья русской национальности, имеющей отягощенный семейный анамнез, на этапе прегравидарной подготовки была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров было выявлено отсутствие аллеля G, генотип AA, полиморфного локуса rs4444903 гена EGF, что позволило отнести ее в группу беременных с низким риском развития СЗРП. Это подтвердило дальнейшее наблюдение после наступления беременности: в течение

беременности и после родов не было выявлено признаков СЗРП.

Таким образом, предложенный способ дает возможность прогнозирования риска развития синдрома задержки роста плода у беременных русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья России и имеющих отягощенный семейный анамнез по ЗРП, с учетом полиморфизма rs4444903 гена эпидермального фактора роста (EGF).

(57) Формула изобретения

Способ прогнозирования риска развития синдрома задержки роста плода у беременных, являющихся уроженками Центрального Черноземья русской национальности и имеющих отягощенный семейный анамнез по задержке роста плода, включающий выделение ДНК из периферической венозной крови и анализ полиморфизма гена эпидермального фактора роста EGF, высокий риск развития синдрома задержки роста плода у беременных с отягощенным семейным анамнезом определяется при выявлении аллеля G полиморфного локуса rs4444903 гена EGF.

20

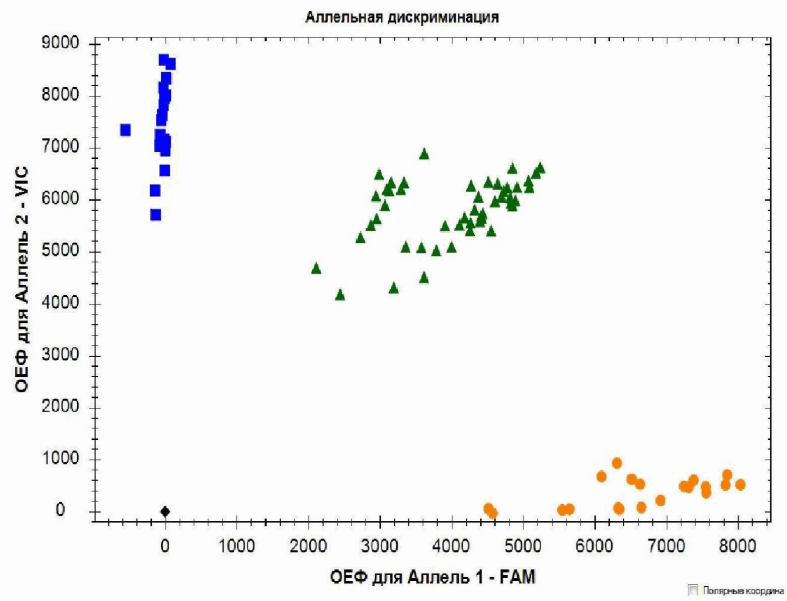
25

30

35

40

45



Фиг. 1