



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12Q 1/6806 (2021.08); C12N 15/00 (2021.08)

(21)(22) Заявка: 2021108298, 26.03.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.03.2021

Дата регистрации:
30.11.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 26.03.2021

(45) Опубликовано: 30.11.2021 Бюл. № 34

Адрес для переписки:

450008, г. Уфа, Ленина, 3,
БАШГОСМЕДУНИВЕРСИТЕТ, Патентный
отдел

(72) Автор(ы):

Чуйкин Олег Сергеевич (RU),
Гильманов Марсель Венерович (RU),
Викторова Татьяна Викторовна (RU),
Кучук Кристина Николаевна (RU),
Кочетова Ольга Владимировна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Башкирский государственный
медицинский университет" Министерства
здравоохранения Российской Федерации
(RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: Riley B. M. et al., Impaired FGF
signaling contributes to cleft lip and palate,
Proceedings of the National Academy of Sciences,
2007, Т. 104, No. 11, pp. 4512-451. Prescott N. J.,
et al., Nonsyndromic cleft lip and palate: complex
genetics and environmental effects, Annals of
human genetics, 2001, Т. 65, No. 6, pp. 505-515.
Чуйкин О. С. и др. (см. прод.)

(54) Способ прогнозирования врожденной расщелины губы и нёба у ребёнка при планировании беременности в регионе с экотоксикантами с применением генетических маркеров

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, а именно к стоматологии, и может быть использовано для прогнозирования врожденной расщелины губы и нёба у ребенка при планировании беременности в регионе с экотоксикантами с применением генетических маркеров. Проводят выделение ДНК из лимфоцитов периферической венозной крови

матери, методом полимеразной цепной реакции проводят амплификацию полиморфных локусов генов глутатион S-трансферазы M1 (GSTM1) и генаглутатион S-трансферазы P1 (GSTP1) с использованием специфических последовательностей олигонуклеотидных праймеров. 2 табл., 3 пр.

(56) (продолжение):

Анализ полиморфизма гена метионинсинтазы-редуктазы в прогнозировании врожденной патологии челюстно-лицевой области, Стоматология детского возраста и профилактика, 2018, Т. 18, номер 4, стр. 57-60. ВУ 12750 С1, 30.12.2009.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12Q 1/6806 (2021.08); *C12N 15/00* (2021.08)(21)(22) Application: **2021108298, 26.03.2021**(24) Effective date for property rights:
26.03.2021Registration date:
30.11.2021

Priority:

(22) Date of filing: **26.03.2021**(45) Date of publication: **30.11.2021 Bull. № 34**

Mail address:

**450008, g. Ufa, Lenina, 3,
BASHGOSMEDUNIVERSITET, Patentnyj otdel**

(72) Inventor(s):

**Chujkin Oleg Sergeevich (RU),
Gilmanov Marsel Venerovich (RU),
Viktorova Tatyana Viktorovna (RU),
Kuchuk Kristina Nikolaevna (RU),
Kochetova Olga Vladimirovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe byudzhethoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Bashkirskij gosudarstvennyj
meditsinskij universitet" Ministerstva
zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii (RU)****(54) METHOD FOR PREDICTING CONGENITAL CLEFT LIP AND PALATE IN A CHILD WHEN PLANNING PREGNANCY IN A REGION WITH ECOTOXICANTS USING GENETIC MARKERS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology, namely to dentistry, and can be used to predict congenital cleft lip and palate in a child when planning pregnancy in a region with ecotoxics using genetic markers. DNA is isolated from lymphocytes of peripheral venous blood of the mother, the polymerase chain reaction method is used to amplify the

polymorphic loci of the genes glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and genaglutathione S-transferase P1 (GSTP1) using specific sequences of oligonucleotide primers.

EFFECT: improvement of prediction of congenital cleft lip.

1 cl, 2 tbl, 3 ex

Изобретение относится к медицине, а именно к стоматологии, и может быть использовано для прогнозирования врожденной расщелины губы и нёба у ребенка при планировании беременности в регионе с экотоксикантами с применением генетических маркеров.

5 Врожденная расщелина губы и нёба (ВРГН) - это тяжелый порок развития челюстно-лицевой области, проявляющийся нарушением непрерывности верхней губы, альвеолярного отростка и нёба и сопровождающийся значимыми функциональными нарушениями. Вероятной причиной формирования ВРГН является воздействие факторов внешней среды, таких как физические факторы (радиация, температура), химические соединения, обладающие тератогенным действием, а также биологические агенты.

10 Проведенные близнецовые и семейные исследования выявили, что генетические факторы играют важную роль в этиологии ВРГН [Lie RT, 1994, GeX, 2019]. Показано, что при семейном наследовании риск рецидива в первом поколении родственников у лиц с ВРГН примерно в 40 раз больше, чем в общей популяции. В некоторых родословных можно установить менделевский тип наследования [LieRT, 2001, SkjaervenR., 1999]. Однако в большинстве случаев ВРГН представлен несиндромальной формой, т.е. является многофакторным заболеванием. Несиндромальная расщелина губы и нёба является одним из наиболее распространенных полигенных заболеваний [Ge X., 2019]. На развитие такой формы ВРГН оказывают влияние факторы окружающей среды. В сочетании определенных факторов внешней среды и генотипа формируется большинство случаев ВРГН, что усложняет осуществление генетического анализа несиндромальных форм ВРГН и раннее выявление таких случаев.

Используя более узкий и функционально обоснованный метод анализа генетических изменений, так называемый ген-кандидатный подход, были выявлены гены, ассоциированные с ВРГН. В последнее время стали активно изучаться гены, участвующие в биотрансформации ксенобиотиков (CYP1A1, GSTM1, NAT2), принимающие участие в обезвреживании чужеродных соединений у человека. Вместе с тем, получаемые при этом ассоциации отличаются противоречивостью, что объясняется различными частотами полиморфных вариантов этих генов в различных популяциях. 25 Интересным представляется тот факт, что при одинаковом воздействии вредных факторов среды на организм беременных женщин не у всех рождаются дети с ВРГН. Это можно объяснить с точки зрения наличия генетически детерминированной индивидуальной чувствительности организма на действие среды. В данной связи актуальным представлялось провести анализ полиморфных вариантов генов детоксикации ксенобиотиков у матерей.

35 Наиболее близким аналогом изобретения является способ прогнозирования возникновения врожденной расщелины губы и нёба у детей, проживающих в регионе с нефтехимической промышленностью, заключающийся в том, что методом комплексного молекулярно-генетического анализа полиморфизма генов ферментов детоксикации ксенобиотиков CYP1A1, GSTM1 и GSTP1 установлена ассоциация мутантного аллеля Val полиморфного локуса Ile462Val гена CYP1A1 с риском развития расщелины верхней губы и нёба, выявлена взаимосвязь мутантного аллеля Val полиморфного локуса Ile105Val гена GSTP1 с риском развития расщелины губы и нёба у мальчиков. Молекулярно-генетический анализ проведен у 100 больных с изолированной ВРГН, в возрасте от 6 месяцев до 17 лет, находившихся на лечении в отделении челюстно-лицевой хирургии РДКБ [Шайхутдинова Д.И. Использование генетических маркеров для прогнозирования возникновения врожденной расщелины губы и нёба у детей, проживающих в регионе с нефтехимической промышленностью.

Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. Москва-2007]. Недостатком прототипа является недостаточная точность прогноза, так как исследование проводили с использованием крови детей, локусы аллелей Val гена CYP1A1 и Val гена GSTP1 менее эффективны и менее изучены и проверены на

практике.

Техническим результатом изобретения является повышение точности прогноза.

Предлагаемый способ прогнозирования ВРГН у ребенка при планировании беременности в регионе с экотоксикантами осуществляется следующим образом. Кровь матери набирают в пробирки со стандартным консервантом (ЭДТА) в соотношении

4:1.

Для получения ДНК необходимой степени чистоты и достаточного молекулярного веса используют метод выделения ДНК из крови фенольно-хлороформной экстракцией, описанный Мэтью [Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA // Methods in Molecular Biology. / Ed. Walker J.M., N.Y., L.: Human Press.; - 1984. - V. 2. - P.31-34].

1. Кровь в пробирке с консервантом тщательно перемешивают и переливают в центрифужный стакан на 100 мл, туда же добавляют 40 мл охлажденного лизирующего буфера, содержащего 320 мМ сахарозы, 1% раствор тритона X-100, 5 мМ MgCl₂, 10 мМ трисHCl (pH 7,6).

2. Смесь центрифугируют при 4°C и 4000 об/мин в течение 20 минут.

3. Надосадочную жидкость сливают, к получившемуся осадку повторно добавляют 10 мл охлажденного лизирующего буфера, содержащего 320 мМ сахарозы, 1% раствор тритона X-100, 5 мМ MgCl₂, 10 мМ трисHCl (pH 7,6).

4. Смесь центрифугируют при 4°C и 4000 об/мин в течение 10 минут.

5. Полученный осадок ресуспензируют в 400 мкл буфера SolineEDTA (25 мМ EDTA, NaCl 5М, pH8,0).

6. Добавляют 40 мкл 10% SDS и 30-40 мкл протеиназы К («Promega» США; 10 мг/мл).

7. Инкубируют при 37°C в течение 16 часов.

Экстракцию ДНК осуществляют в следующем порядке.

1. Раствором забуференного фенола (200 мкл меркаптоэтанола на 50 мл фенола - Трис-HCl, pH 7,8), смесью фенола - хлороформа (1:1) и хлороформом (2 мл изоамилового спирта на 48 мл хлороформа) в равных объемах (1000 мкл) с плавным перемешиванием на ротаторе в течение 10 мин.,

2. Центрифугируют при 10000-12000 об/мин в течение 8-10 мин и отбирают водную фазу, содержащую ДНК, РНК и неденатурированные белки после каждого этапа.

3. Преципитацию ДНК производят добавлением двух объемов охлажденного 96% этанола.

4. Осажденную ДНК дважды промывают 96% раствором этилового спирта.

5. Подсушивают на воздухе.

6. Образовавшийся осадок ДНК растворяют в 1,5 мл деионизированной H₂O; раствор хранят при -20°C.

В дальнейшем полученную ДНК используют в качестве матрицы для полимеразной цепной реакции (ПЦР) для амплификации полиморфных локусов генов GSTM1 и GSTP1.

Состав реакционной смеси для ПЦР следующий: 1,25 мкл 10X ПЦР-буфера (60 мМ Tris-HCl, pH 8,5, 1,5 мМ MgCl₂, 25 мМ KCl, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1% тритон X-100), 1,0 мкл смеси 5 мМ dNTP («Сибэнзим»), около 200 нг геномной ДНК, 1 ед Taq-полимеразы («Сибэнзим»), необходимое количество деионизированной воды до объема

12,5 мкл, а также по 0,5 мкл соответствующих праймеров, предварительно разбавленных до концентрации 1 ОЕ/мл.

Режим амплификации следующий: предварительная денатурация (94°C, 5-7 мин), 30-32 цикла амплификации: денатурация - 94°C, 40 сек; отжиг - 55°C (температура варьирует от 54°C до 60°C) 40 сек; синтез - 72°C, 1 мин, завершающий синтез (72°C, 5 - мин).

После амплификации ПЦР-продукты всех полиморфизмов подвергают гидролизу соответствующими эндонуклеазами рестрикции. Для этого 5 мкл амплификата смешивают с 5 ед. фермента в соответствующем буфере, смесь выдерживают при определенной температуре согласно рекомендациям производителей («Сибэнзим», «Fermentas», «Promega») в течение ночи.

Специфические последовательности олигонуклеотидных праймеров для гена GSTM1 взяты из работы Baranova H., et al., 1997 [Baranova, H., Bothorishvilli, R., Canis, M., Albuissou, E., Perriot, S., Glowaczower, E.,... & Malet, P. (1997). Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism and susceptibility to endometriosis in a French population. *Molecular human reproduction*, 3(9), 775-780.].

Специфические последовательности олигонуклеотидных праймеров для гена GSTP1 взяты из работы Harries LW. et al, 1997 [Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GC, Wolf CR. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis*. 1997 Apr;18(4):641-4. doi: 10.1093/carcin/18.4.641. PMID: 9111193.].

Амплифицированные фрагменты ДНК разделяют электрофоретически в 7-8%-ном полиакриламидном неденатурированном геле (ПААГ). Электрофорез проводят в однократном трисборатном буфере (0,089 М Трис-НСl pH=7,8; 0,089 М борная кислота; 0,002 М ЭДТА с pH=8,0) в вертикальных стеклянных пластинах при постоянном напряжении 250-300 вольт после 30-минутного преэлектрофореза. Перед нанесением на гель пробы смешивают в соотношении 1:5 с буфером, содержащим 0,25% бромфенолового синего, 0,25% ксиленцианола, 15% фикола. Для визуализации результатов гель окрашивают раствором бромистого этидия (0,1 мкг/мл) в течение 10 минут и анализируют в проходящем ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе («VilberLourmat», TCP-20M). Размеры аллелей определяют путем одновременного электрофореза с маркером (ДНК фага λ, гидролизированный рестриктазой PstI).

Идентификацию генотипов гена GSTM1 проводят следующим образом: наличие ПЦР-продукта размером 271 пн интерпретируют как нормальный вариант (генотип GSTM1*N или NN), отсутствие ПЦР-продукта интерпретируют как наличие делеции в гомозиготном состоянии (генотип GSTM1*del или del/del).

Идентифицированные генотипы AG-GG полиморфного локуса rs1695 гена GSTP1 выявляют следующим образом. Аллель А размером 176 пн, аллель G размером 91 пн и 85 пн. Соответственно гомозиготы AA имеют одну полосу продукта определяемую как 176 пн, гетерозиготы AG имеют три полосы, 176 пн, 91 пн и 85 пн и гомозиготы GG на электрофорезе определяются двумя полосами 91 пн и 85 пн.

При выявлении в сочетании рискованных генотипов двух генов глутатион-S-трансфераз: делеции гена GSTM1 и генотипов AG или GG локуса rs1695 гена GSTP1 прогнозируют высокий риск рождения ребенка с врожденной расщелиной губы и нёба.

В качестве контроля обследовали группу практически здоровых индивидов, проживающих на территории Республики Башкортостан (119 человек), не имеющих данной патологии.

Результаты молекулярно-генетического анализа делеции гена GSTM1 и генотипов AG-GG локуса rs1695 гена GSTP1 у матерей с детьми с врожденной расщелиной губы и

нёба (25 человек) и в контрольной группе, не имеющих данной патологии, представлены в таблице 1.

Анализ распределения генотипов и аллелей генов глутатион-S-трансфераз показал, что у родителей-носителей делеции гена GSTM1 чаще рождались дети с ВРГН (OR=2.65 (CI 95% 1.10-6.41), P=0.028). Статистически значимая ассоциация была показана и при сравнении частот аллелей. В группе родителей детей с ВРГН частота делеции достигала 60.0% тогда как у здорового контроля на долю этого аллеля приходилось 36.13% (табл. 1). Показатель отношения шанса в родительской группе составил OR=2.65 (CI 95% 1.42-4.95), P=0.003.

Статистически значимые различия были получены в аддитивной модели (OR=2.21 (CI 95% 1.05-4.67), P=0.038) (табл. 2). В данном случае присутствие аллеля G в генотипе пациента увеличивает риск рождения ребенка с ВРГН в 2.21 (CI 95% 1.05-4.67), (P=0.038).

Сущность изобретения поясняется следующими клиническими примерами.

Пример 1. Пациентка И., 29 лет, имеет наследственную отягощенность по ВРГН (в анамнезе ВРГН у сестры). Обратилась по вопросу определения генетического риска развития будущего ребенка. У матери было взято 4 мл венозной крови с последующим выделением ДНК методом фенольно-хлороформной экстракции и амплификацией фрагментов генов GSTP1 и GSTM1 в реакционной смеси, содержащей 0,1-1 мкг геномной ДНК, 1 ед. Taq-полимеразы, 0,25 мкМ каждого олигопраймера, 250 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата в 25 мкл однократного буфера для ПЦР. После амплификации провели электрофорез фрагментов гена GSTM1 при постоянном напряжении 250-300 вольт после 15-минутного преэлектрофореза. После окончания электрофореза гель окрасили раствором бромистого этидия в течение 10 минут и анализировали при ультрафиолетовом освещении на трансиллюминаторе.

Было осуществлено расщепление полученного амплификата локуса rs1695 гена GSTP1 с добавлением фермента BsoMAI. Получен гетерозиготный генотип AG, определяющий повышенный риск ВРГН.

При исследовании полиморфного локуса GSTM1 был выявлен генотип del/del, при котором показатель соотношения шансов развития ВРГН составляет 2.65 (таблица 1). Вывод: учитывая повышенный генетический риск ВРГН у ребенка пациента, родителям были предложены превентивные мероприятия: прием фолиевой кислоты и поливитамины, отказ от вредных привычек. Данные рекомендации не были выполнены в полном объеме, дочь пациентки родилась с ВРГН.

Пример 2. Пациентка Я., 35 лет, имеющая факторы риска ВРГН - работа во вредных условиях труда. Было предложено проведение молекулярно-генетического исследования для определения риска развития ВРГН при следующих беременностях. У пациентки Я. было взято 4 мл венозной крови с последующим выделением ДНК методом фенольно-хлороформной экстракции и амплификацией фрагментов генов GSTP1 и GSTM1 в реакционной смеси, содержащей 0,1-1 мкг геномной ДНК, 1 ед. Taq-полимеразы, 0,25 мкМ каждого олигопраймера, 250 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата в 25 мкл однократного буфера для ПЦР. После амплификации провели электрофорез фрагментов при постоянном напряжении 250- 300 вольт после 15-минутного преэлектрофореза. После окончания электрофореза гель окрасили раствором бромистого этидия в течение 10 минут и анализировали при ультрафиолетовом освещении на трансиллюминаторе. При исследовании полиморфного локуса rs1695 гена GSTP1 был выявлен генотип пониженного риска AA (показатель соотношения шансов развития ВРГН составляет 0,45), а при исследовании полиморфного локуса гена GSTM1 был выявлен генотип NN (таблица 1). Прогноз в отношении развития ВРГН

благоприятный. В дальнейшем пациентка к врачу не обращалась.

Пример 3. Пациентка А. имеет первого ребенка с ВРГН, причем пациентка работает во вредных условиях труда нефтехимического производства. Обратилась по вопросу определения генетического риска развития будущего ребенка. У матери было взято 4 мл венозной крови с последующим выделением ДНК методом фенольно-хлороформной экстракции и амплификацией фрагментов генов GSTP1 и GSTM1 в реакционной смеси, содержащей 0,1-1 мкг геномной ДНК, 1 ед. Таq-полимеразы, 0,25 мкМ каждого олигопрайма, 250 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата в 25 мкл однократного буфера для ПЦР. После амплификации провели электрофорез фрагментов гена GSTM1 при постоянном напряжении 250-300 вольт после 15-минутного преэлектрофореза.

После окончания электрофореза гель окрасили раствором бромистого этидия в течение 10 минут и анализировали при ультрафиолетовом освещении на трансиллюминаторе.

Было осуществлено расщепление полученного амплификата локуса rs1695 гена GSTP1 с добавлением фермента BsoMAI. Получен гомозиготный GG генотип, определяющий высокий риск ВРГН.

При исследовании полиморфного локуса GSTM1 был выявлен генотип del/del.

Вывод: учитывая высокий генетический риск ВРГН у ребенка пациента, родителям были предложены превентивные мероприятия: прием фолиевой кислоты и поливитамины, отказ от вредных привычек и отказ от работы на вредном производстве. Данные рекомендации не были выполнены в полном объеме, ребенок пациентки родился с ВРГН.

Таблица1

Анализ распределения частоты генотипов и аллелей полиморфных локусов генов-кандидатов у родителей и в контроле

Ген	Генотип	Контроль (N=119) n (%)	Родители (N=25) n (%)	OR (CI95%)	P
Гены глутатион-S-трансфераз					
<i>GSTP1</i> <i>rs1695</i>	AA	80 67,23	12 48,00	1.00	0.11
	AG	37 31,09	11 44,00	1.98 (0.80-4.91)	
	GG	2 1,68	2 8,00	6.67 (0.86-51.88)	
	A	197 82,77	35 70,00	2.05 (1.03-4.11)	0.06
	G	41 17,23	15 30,00		
<i>GSTM1</i> Делеция	n/n	76 (63.9%)	10 (40%)	1.00	0.028
	del/del	43 (36.1%)	15 (60%)	2.65 (1.10-6.41)	
	n del	152 63,87 86 36,13	20 40,00 30 60,00	2.65 (1.42-4.95)	0.003

Таблица 2

Анализ ассоциаций генов-кандидатов у родителей

Ген	Генотип	Контроль (N=119) (%)	Родители (N=25) (%)	OR (CI95%)	P
Гены глутатион-S-трансфераз					
<i>GSTP1</i> <i>rs1695</i>	AA AG-GG Dominant	80 (67.2%) 39 (32.8%)	12 (48%) 13 (52%)	1.00 2.22 (0.93-5.32)	0.074
	AA-AG GG Recessive	117 (98.3%) 2 (1.7%)	23 (92%) 2 (8%)	1.00 5.09 (0.68-37.98)	0.13
	Log-additive	---	---	2.21 (1.05-4.67)	0.038

(57) Формула изобретения

Способ прогнозирования врожденной расщелины губы и нёба у ребенка при планировании беременности в регионе с экотоксикантами, включающий выделение ДНК из лимфоцитов периферической венозной крови, генотипирование методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК полиморфного локуса генов глутатион S-трансферазы M1 (GSTM1) и глутатион S-трансферазы P1 (GSTP1) с использованием специфических последовательностей олигонуклеотидных праймеров, отличающийся тем, что используют кровь матери, проводят генотипирование полиморфного локуса *rs1695* гена *GSTP1* и при выявлении делеции гена *GSTM1* и генотипов AG или GG локуса *rs1695* гена *GSTP1* прогнозируют высокий риск рождения ребенка с врожденной расщелиной губы и нёба.