



(51) МПК  
*A61B 5/00* (2006.01)  
*C12Q 1/6883* (2018.01)  
*G01N 33/50* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
*A61B 5/00* (2020.02); *C12Q 1/6883* (2020.02); *G01N 33/50* (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2019122327, 16.07.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 16.07.2019

Дата регистрации:  
 26.08.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 16.07.2019

(45) Опубликовано: 26.08.2020 Бюл. № 24

Адрес для переписки:  
 117997, Москва, ул. Островитянова, 1, ФГАОУ  
 ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава  
 России, отдел охраны интеллектуальной  
 собственности и коммерциализации РИД

(72) Автор(ы):

Аветисова Кристина Григорьевна (RU),  
 Клименко Петр Афанасьевич (RU),  
 Курцер Марк Аркадьевич (RU),  
 Савельева Галина Михайловна (RU),  
 Шалина Раиса Ивановна (RU),  
 Спиридовон Дмитрий Сергеевич (RU),  
 Костюк Светлана Викторовна (RU),  
 Костюк Эдмунд Владимирович (RU),  
 Вейко Наталья Николаевна (RU),  
 Шмарина Галина Васильевна (RU),  
 Ершова Елизавета Сергеевна (RU),  
 Полеткина Анастасия Андреевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное автономное  
 образовательное учреждение высшего  
 образования "Российский национальный  
 исследовательский медицинский университет  
 имени Н.И. Пирогова" Министерства  
 здравоохранения Российской Федерации  
 (ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова  
 Минздрава России) (RU),  
 Федеральное государственное бюджетное  
 научное учреждение "Медико-генетический  
 научный центр имени академика Н.П.  
 Бочкова" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
 о поиске: RU 2653765 C1, 14.05.2018. RU  
 2611358 C1, 21.02.2017. RU 2682251 C1,  
 18.03.2019. US 20190002981 A1, 03.01.2019. WO  
 2014078622 A1, 22.05.2014. CN 108624673 A,  
 09.10.2018. СКРИПНИЧЕНКО Ю.П. и др.  
 Определение уровня митохондриальной ДНК  
 в крови для прогнозирования осложнений  
 беременности. Акушерство и гинекология,  
 2018, 2, стр.44-49.

(54) Способ диагностики тяжелой преэклампсии у беременных

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно

к акушерству, гинекологии, молекулярной

R U 2 7 3 0 9 5 8 C 1

R U 2 7 3 0 9 5 8 C 1

биологии, молекулярной генетике, биохимии, и может быть использовано для диагностики тяжелой преэклампсии у беременных. В плазме крови беременной определяют концентрацию внеклеточной ДНК (вк ДНК), число копий рибосомальной ДНК в составе внеклеточной ДНК (вк рДНК), число копий митохондриальной ДНК в составе внеклеточной ДНК (вк мтДНК), нуклеазную активность ДНКазы 1. В ядерной ДНК лейкоцитов определяют число копий геномной рибосомальной ДНК (геном рДНК), число копий геномной митохондриальной ДНК

(геном мтДНК). При вк ДНК более 1000 нг/мл, вк рДНК более 1000, вк мтДНК более 200, отношении вк рДНК к геном рДНК более 2, отношении вк мтДНК к геном мтДНК более 1,64, нуклеазной активности ДНКазы 1 более 10 ед/мл, диагностируют тяжелую преэклампсию. Способ обеспечивает точное выявление тяжелого течения преэклампсии за счет определения набора молекулярно-биологических факторов – критериев объективной достоверной диагностики тяжелых асимптомных форм преэклампсии. З пр.



(51) Int. Cl.  
*A61B 5/00* (2006.01)  
*C12Q 1/6883* (2018.01)  
*G01N 33/50* (2006.01)

FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

*A61B 5/00* (2020.02); *C12Q 1/6883* (2020.02); *G01N 33/50* (2020.02)

(21)(22) Application: 2019122327, 16.07.2019

(24) Effective date for property rights:  
16.07.2019

Registration date:  
26.08.2020

Priority:

(22) Date of filing: 16.07.2019

(45) Date of publication: 26.08.2020 Bull. № 24

Mail address:  
117997, Moskva, ul. Ostrovityanova, 1, FGAOU  
VO RNIMU im. N.I. Pirogova Minzdrava Rossii,  
otdel okhrany intellektualnoj sobstvennosti i  
kommertsializatsii RID

(72) Inventor(s):

Avetisova Kristina Grigorevna (RU),  
Klimenko Petr Afanasevich (RU),  
Kurtser Mark Arkadevich (RU),  
Saveleva Galina Mikhajlovna (RU),  
Shalina Raisa Ivanovna (RU),  
Spiridonov Dmitrij Sergeevich (RU),  
Kostyuk Svetlana Viktorovna (RU),  
Kostyuk Edmund Vladimirovich (RU),  
Vejko Natalya Nikolaevna (RU),  
Shmarina Galina Vasilevna (RU),  
Ershova Elizaveta Sergeevna (RU),  
Poletkina Anastasiya Andreevna (RU)

(73) Proprietor(s):

federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe  
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego  
obrazovaniya "Rossijskij natsionalnyj  
issledovatelskij meditsinskij universitet imeni  
N.I. Pirogova" Ministerstva zdravookhraneniya  
Rossijskoj Federatsii (FGAOU VO RNIMU im.  
N.I. Pirogova Minzdrava Rossii) (RU),  
Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe  
nauchnoe uchrezhdenie "Mediko-geneticheskij  
nauchnyj tsentr imeni akademika N.P.  
Bochkova" (RU)

(54) DIAGNOSTIC TECHNIQUE FOR SEVERE PREECLAMPSIA IN PREGNANT WOMEN

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine, namely to obstetrics, gynaecology, molecular biology, molecular genetics, biochemistry, and can be used for diagnosing severe preeclampsia in pregnant women. Blood plasma of the pregnant woman is examined for concentration of extracellular DNA (ec DNA), number of copies of ribosomal DNA in extracellular DNA (ec rRNA), number of copies of mitochondrial DNA in extracellular DNA (ec mtDNA), nuclease activity of DNase 1. Nuclear leukocyte DNA is used to determine the number of copies of genomic ribosomal DNA

(rDNA genome), number of copies of genomic mitochondrial DNA (mtDNA genome). If the ec DNA is more than 1000 ng/ml, ec rDNA more than 1000, ec mtDNA more than 200, the ratio of ec rDNA to the rDNA genome is more than 2, the ratio of ec mdDNA to the mtDNA genome is more than 1.64, the nuclease activity of DNase 1 is more than 10 units/ml, is diagnosed severe preeclampsia.

EFFECT: method provides accurate detection of severe preeclampsia by determining a set of molecular-biological factors - criteria for objective reliable diagnosis of severe asymptomatic forms of

RU 2730958 C1

RU 2730958 C1

R U 2 7 3 0 9 5 8 C 1

preeclampsia.

1 cl, 3 ex

R U 2 7 3 0 9 5 8 C 1

Настоящее изобретение относится к медицине, а именно к акушерству и гинекологии, а также, к молекулярной биологии, молекулярной генетике, биохимии, может быть использовано при определении критического (тяжелого) состояния беременных, в том числе и с атипичным течением преэклампсии для корректного выбора врачебной тактики.

Преэклампсия представляет собой осложнение беременности, для которой свойственны глубокие расстройства жизненно важных органов и систем, часто сопровождающиеся развитием плацентарной недостаточности и гипотрофии плода. В настоящее время по данным ВОЗ преэклампсия осложняет 2,2% беременностей и имеется тенденция роста частоты ее встречаемости.

Проспективное исследование всех случаев эклампсии, произошедших в Великобритании в 1992 г. (383 случая, частота 4,9 на 10000 родов), показало, что в 38,0% случаев приступы развились до того, как появились и были диагностированы протеинурия и артериальная гипертензия [Douglas K.A., Redman C.W. / Eclampsia in the United Kingdom // BMJ, 1994; 309: 1395-1400].

Учитывая тот факт, что все три классических симптома (артериальная гипертензия, отеки и протеинурия) преэклампсии редко обнаруживаются у беременных одновременно, были предложены новые названия этого осложнения. К ним можно отнести номенклатуру «артериальная гипертензия», «атипическая преэклампсия». К «атипической преэклампсии» относят случаи с отсутствием одного или более симптомов, подчеркивая факт частоты развития таких вариантов в сроки до 20 недель беременности [Sibai B.M. / Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia // Obstet Gynecol, 102 (1) (2003), pp. 181-192].

Существует целый комплекс субъективных причин, затрудняющих оценку степени тяжести преэклампсии. К ним относятся следующие субъективные причины: отсутствие точных знаний об этиологии и патогенезе, высокая частота встречаемости атипично протекающей преэклампсии, узкий диапазон характеристик, ориентированных на небольшое количество критериев, не принадлежащих к специфическим из доказательной медицины: повышение АД, протеинурия, тесты функциональной диагностики, антропометрия, допплерометрия и др.

Известны способы прогнозирования тяжелых форм преэклампсии, основанные на определении молекулярно-биологических и генетических факторов.

Известен способ прогнозирования риска развития преэклампсии тяжелого течения с учетом генетических данных (RU 2653765 C1). Способ осуществляют следующим образом. ДИК выделяют из образцов периферической венозной крови пациенток в 2 этапа. На первом этапе к 4 мл крови добавляют 25 мл лизирующего буфера, содержащего 320 mM сахарозы, 1% тритон X-100, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM трис-HCl (рН 7,6). Полученную смесь перемешивают и центрифугируют при 4°C, 4000 об/мин в течение 20 минут. После центрифугирования надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют 4 мл раствора, содержащего 25 mM ЭДТА (рН 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, деионизованной воде и хранят при -20°C.

Выделенную ДНК затем подвергают полимеразной цепной реакции с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров. Получают генетические полиморфизмы MMP-2 (rs243865), MMP-8 (rs11225395), MMP-8 (rs1320632), MMP-9 (rs17577) и прогнозируют повышенный риск развития преэклампсии тяжелого течения при наличии 5 сочетания генетических вариантов G MMP-9 (rs17577) и G MMP-8 (rs1320632), пониженный риск развития преэклампсии тяжелого течения - при наличии сочетания генетических вариантов T MMP-2 (rs243865) и A MMP-9 (rs17577). Однако известный способ не позволяет определять критическое состояние здоровья пациенток при 10 преэклампсии для определения врачебной тактики - пролонгирование или прерывание беременности.

Известен также способ прогнозирования высокого риска репродуктивных потерь в первом триместре беременности (RU 2611358 C1), который включает выделение ДНК из периферической венозной крови беременных и последующую амплификацию 15 полиморфного варианта A66G гена метионинсингтазы редуктазы MTRR. Способ осуществляют следующим образом: в пробирку типа Эппендорф вносят 1000 мкл цельной крови пациентки, центрифугируют пробу со скоростью 3000 об/мин в течение 5 мин. Аккуратно удаляют плазму. Закрывают пробирку и замораживают ее при -20°C до полного замораживания форменных элементов не менее 1 часа. Размораживают 20 содержимое пробирки при комнатной температуре. Вносят в пробирку реактив «ДНК-экспресс-кровь» объемом, равным объему оставшихся в пробирке форменных элементов. Содержимое пробирки тщательно перемешивают на вортексе. Устанавливают пробирку в предварительно прогретый до 99°C термостат и выдерживают в течение 15 мин. По окончании охлаждают до 70°C. Центрифугируют пробирку со скоростью 12000 об/мин 25 при комнатной температуре в течение 60 сек. Полученный супернатант используют в качестве исследуемого образца ДНК. Выделенную ДНК затем подвергают полимеразной цепной реакции с использованием наборов реагентов SNP-экспресс (Литех, Россия) согласно инструкции производителя. Проводят амплификацию аллельных вариантов генов провоспалительных цитокинов - 31C-T(rs1143627) IL-1 $\beta$ , -174G-C (rs1800795) IL-6 и ферментов фолатного цикла C677T (rs1801133) MTHFR и при выявлении одного из 30 четырех генотипов: -31CT IL-1 $\beta$  / -174GG IL-6 / 677CT MTHFR / 66GG MTRR; -31CT IL-1 $\beta$  / -174CC IL-6 / 677CC MTHFR / 66AG MTRR; -31CC IL-1 $\beta$  / -174CC IL-6 / 677CC MTHFR/ 66AG MTRR; -31CC IL-1 $\beta$  / -174GC IL-6 / 677CT MTHFR/ 66AG MTRR прогнозируют высокий риск репродуктивных потерь в первом триместре беременности. Этот способ также не дает возможности проводить определение тяжести преэклампсии 35 для выбора врачебной тактики - пролонгирование или прерывание беременности.

В качестве прототипа нами выбран классический способ определения тяжелой преэклампсии у беременных по триаде Цангемейстера (отеки, протеинурия, артериальная гипертензия) для корректного выбора врачебной тактики [Шалина Р.И., Михалева Л.М., Симухина М.А., Коноплянников А.Г., Штабницкий А.М. / Особенности 40 клинического течения тяжелых форм преэклампсии в современных условиях // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2017. Т. 16. №6. С. 16-23].

Однако в настоящее время не редко отсутствуют все три классические симптомы преэклампсии. Так, по данным Савельевой Г.М. и соавт. [Савельева Г.М., Шалина Р.И., Курцер М.А. и др. / Эклампсия в современном акушерстве // Акуш. и гинек., 2010, №6, 45 С. 4-10], артериальная гипертензия выше 160/100 мм рт.ст. определялась лишь в 25,5% случаев эклампсии, а в остальных находилась в пределах 130/90-150/100 мм рт.ст. и ниже. Протеинурия не была подтверждена в 25,0% случаев эклампсии. Выявлены большие различия в тяжести отечного синдрома, характере субъективных симптомов.

Наличие всех трех симптомов отмечено только в 58,8% случаев.

Нами поставлена задача разработать критерии объективной достоверной диагностики тяжелых асимптомных форм преэклампсии.

Медико-технический результат, достигаемый при осуществлении изобретения,

заключается в снижении материнской и перинатальной смертности и заболеваемости за счет своевременного выбора адекватной врачебной тактики, уточнения показаний к прерыванию беременности путем точного выявления тяжелого течения преэклампсии.

Сущность изобретения заключается в следующем.

Для диагностики тяжелой преэклампсии у беременных в плазме крови определяют

концентрацию внеклеточной ДНК (вк ДНК), число копий рибосомальной ДНК в составе вк ДНК (вк мтДНК) (вк рДНК), число копий митохондриальной ДНК в составе вк ДНК (вк мтДНК), нуклеазную активность ДНКазы 1. В ядерной ДНК лейкоцитов беременной определяют число копий геномной рибосомальной ДНК (геном рДНК), число копий геномной митохондриальной ДНК (геном мтДНК). При концентрации вк ДНК более 1000 нг/мл, вк рДНК более 1000, вк мтДНК более 200, отношении вк рДНК к геном рДНК более 2, отношении вк мтДНК к геном мтДНК более 1,64, нуклеазной активности ДНКазы 1 более 10 ед/мл - диагностируют тяжелую преэклампсию.

Способ осуществляется следующим образом.

Пробы свежевзятой (с антикоагулянтом) периферической крови пациентов

центрифугировали при 400g 10 мин, плазму отбирали в сухие пробирки, далее плазму и красные осадки замораживали и хранили при -80°C.

Молекулярно-биологические факторы в крови, приведенные в нашем исследовании:

вк ДНК - концентрация ДНК в плазме крови в нг/мл;

вк рДНК - число копий или повторов рибосомальной ДНК в составе внеклеточной

ДНК;

вк мтДНК - число копий или повторов митохондриальной ДНК в составе внеклеточной ДНК. По своему строению напоминает плодную ДНК, обладает мощным стимулирующим эффектом, может провоцировать прерывание беременности;

ДНК-аза 1 - фермент, разрушающий ДНК в ед/мл;

геном рДНК (геномная рДНК) - число копий, повторов ядерной лейкоцитарной рибосомальной ДНК в ядерной ДНК;

геном мтДНК (геномная мтДНК) - число копий, повторов ядерной лейкоцитарной митохондриальной ДНК в ядерной ДНК свидетельствует о гибели лейкоцитов;

вк рДНК/геном рДНК - интегративный показатель, свидетельствующий о накоплении рибосомальной ДНК в кровотоке;

вк мтДНК/геном мтДНК - интегративный показатель, свидетельствующий о накоплении митохондриальной ДНК в кровотоке.

Внеклеточную и геномную ДНК выделяли методом экстракции органическими растворителями, соответственно, из плазмы крови, полученной методом центрифугирования цельной крови, и красных осадков (форменных элементов).

Концентрацию геномной ДНК определяли спектрофотометрически при длине волны 260 нм с учетом светорассеяния (320 нм) в кварцевой кювете при длине хода луча 1 см.

Концентрацию внеклеточной ДНК определяли флуориметрически с использованием интеркалирующего красителя Pico Green (Invitrogen).

Содержание числа копий исследуемого показателя в составе ДНК определяли методом нерадиоактивной количественной дот-гибридизации. Для этого пробы ДНК известной концентрации и набор калибровочных образцов с известным содержанием повторов генома наносили в нескольких повторах на нитроцеллюлозные фильтры, и,

после температурной иммобилизации, инкубировали с набором биотинилированных олигонуклеотидных зондов, сигнал визуализировали при помощи коньюгата стрептавидин-щелочная фосфатаза (Merck) и колориметрического субстрата.

Содержание копий рассчитывали по калибровочной зависимости при помощи

5 компьютерного анализа изображений, вычисляя интегральную интенсивность каждого окрашенного пятна.

Нуклеазную активность ДНКазы 1 плазмы крови исследовали при помощи метода радиальной диффузии в агарозном геле.

Для доказательств возможности реализации заявленного назначения и достижения 10 указанного медико-технического результата приводим следующие данные.

Пример 1.

У беременной А. была взята венозная кровь в 32 недели гестации. При определении 15 характеристик в<sub>к</sub>ДНК в плазме крови было обнаружено: концентрация в<sub>к</sub>ДНК составила 340 нг/мл, число копий рДНК 638 в составе в<sub>к</sub>ДНК, отношение в<sub>к</sub> рДНК/геном рДНК - 1,5, число копий мтДНК 180 в составе в<sub>к</sub>ДНК, отношение в<sub>к</sub> мтДНК/геном мтДНК - 0,44, нуклеазная активность ДНКазы 1-5,4 ед/мл. В течении всей беременности у беременной А. не было симптомов преэклампсии. Она родила в срок девочку (вес 3634 г., рост 52 см). Послеродовый период протекал без осложнений.

Пример 2.

20 У беременной С. была взята венозная кровь в 36 недель беременности при ее поступлении в больницу. В плазме крови было обнаружено: концентрация в<sub>к</sub>ДНК составила 4890 нг/мл, число копий рДНК в составе в<sub>к</sub>ДНК 1750, отношение в<sub>к</sub> рДНК/геном рДНК - 5,4, число копий мтДНК в составе в<sub>к</sub>ДНК 2300, отношение в<sub>к</sub> мтДНК/геном мтДНК - 12,8, нуклеазная активность - ДНКазы 1-18 ед/мл. Диагностировали 25 тяжелую преэклампсию.

В начале родов появились жалобы на головную боль, повышение АД, предсудорожное состояние. Несмотря на проводимое в отделении реанимации соответствующее лечение в течение 2 часов состояние пациентки не улучшилось из-за чего было произведено кесарево сечение. Родился мальчик (вес 2100 гр., рост 47 см).

30 После родов понадобилась соответствующая интенсивная терапия в течение 8 дней.

Пример 3. У беременной В. взята венозная кровь в 39 недель беременности при поступлении в отделение патологии с жалобами на отеки нижних конечностей и повышение артериального давления до 150 мм рт.ст. В плазме крови было обнаружено: концентрация в<sub>к</sub>ДНК составила 580 нг/мл, число копий рДНК 780 в составе в<sub>к</sub>ДНК, 35 отношение в<sub>к</sub> рДНК/геном рДНК - 1,4, число копий мтДНК 198 в составе в<sub>к</sub>ДНК, отношение в<sub>к</sub> мтДНК/геном мтДНК - 0,56, нуклеазная активность - ДНКазы 1-8 ед/мл. Состояние пациентки расценено как умеренная преэклампсия. Проведена симптоматическая терапия, выбрана тактика ведения родов через естественные родовые пути с использованием эпидуральной анестезии. Роды прошли без осложнений, родился 40 мальчик весом 3760 гр., длиной 53 см. Послеродовый период протекал гладко. Выписана из роддома на 5 сутки в удовлетворительном состоянии.

Предлагаемый способ был использован при определении тяжелой преэклампсии у 57 беременных. Во всех случаях диагноз тяжелой преэклампсии был подтвержден клинически, в результате выбора врачебной тактики на основе предлагаемого способа 45 материнской смертности не наблюдалось, перинатальной смертности не было, заболеваемость составила 61,4% из-за незрелости легочной ткани ребенка и респираторных проблем.

Использование данного способа диагностики позволит выявлять критическое

состояние у беременных с малосимптомной преэклампсией; своевременная диагностика и терапия позволит снизить материнскую и перинатальную заболеваемость и смертность, что имеет большое социальное и народнохозяйственное значение.

*5* (57) Формула изобретения

Способ диагностики тяжелой преэклампсии у беременных, отличающийся тем, что в плазме крови беременной определяют концентрацию внеклеточной ДНК (вк ДНК), число копий рибосомальной ДНК в составе внеклеточной ДНК (вк рДНК), число копий митохондриальной ДНК в составе внеклеточной ДНК (вк мтДНК), нуклеазную

*10* активность ДНКазы 1; в ядерной ДНК лейкоцитов определяют число копий геномной рибосомальной ДНК (геном рДНК), число копий геномной митохондриальной ДНК (геном мтДНК) и при вк ДНК более 1000 нг/мл, вк рДНК более 1000, вк мтДНК более 200, отношении вк рДНК к геном рДНК более 2, отношении вк мтДНК к геном мтДНК

*15* более 1,64, нуклеазной активности ДНКазы 1 более 10 ед/мл - диагностируют тяжелую преэклампсию.

20

25

30

35

40

45