



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **113191** (13) **C2**
(51) МПК (2016.01)
A61B 10/00
G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2014 07352</p> <p>(22) Дата подання заявки: 01.07.2014</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 26.12.2016</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 25.03.2015, Бюл.№ 6</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 26.12.2016, Бюл.№ 24</p>	<p>(72) Винахідник(и): Запорожан Валерій Миколайович (UA), Анчева Ірина Анатоліївна (UA), Задорожна Тамара Данилівна (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, пров. Валіховський, 2, м. Одеса, 65082 (UA)</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Тастанова Г.Е. Состояние активности эндотелия сосудов и регуляторов ангиогенеза в системе мать-плацента-плод при осложненной беременности / Г.Е. Тастанова, У.М. Миршарпов, С.З. Саидалиходжаева // Український морфологічний альманах. – 2011.- Т.9. - №4. – С. 99-101. Довжикова И.В. Гистохимическая характеристика активности НАДФ-диафоразы (маркера NO-синтазы), аденилат- и гуанилатциклаз в плаценте при беременности, осложненной герпетической инфекцией / И.В. Довжикова // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2003. – В.15. – С. 14-19. Вазоактивные пептиды плаценты. [Интернет-публікація], ULR: http://web.archive.org/web/20120523010759/http://medkarta.com/?cat=article&id=26479 (збережено WayBack Machine 23.05.2012, знайдено 03.06.2015) Киселева Н.И. Дисфункция эндотелия при гестозе: патогенез, диагностика и лечение / Н.И. Киселев // Охрана материнства и детства. – 2006. - №1(7). – С. 49-56</p>
--	---

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ДИСФУНКЦІЇ ПЛАЦЕНТИ У ВАГІТНИХ З ЗАЛІЗОДЕФІЦИТНОЮ АНЕМІЄЮ

(57) Реферат:

Винахід стосується акушерства та гінекології, для прогнозування дисфункції плаценти у вагітних з залізодефіцитною анемією шляхом проведення імуногістохімічного її дослідження, при якому визначають експресію ендотеліальної нітроксидсинтази плаценти і при відсутності експресії – "-", при сумнівній або парадоксальній експресії – "±" при підвищенній експресії (збільшення щільності позитивних ділянок на 30-50 %) – "+", при гіперекспресії (збільшення позитивних ділянок удвічі) – "+++" показників експресії eNOS у жінок з неускладненим перебігом

UA 113191 C2

вагітності у порівнянні з нормальним рівнем експресії "+" (відповідає контрольним значенням), визначають високий ризик розвитку дисфункції плаценти при наступних вагітностях.

Винахід належить до галузі медицини, зокрема до акушерства, і може використовуватися для прогнозування дисфункції плаценти у вагітних з залізодефіцитною анемією.

Одною з найбільш важливих проблем сучасного акушерства залишається дисфункція плаценти, яка спостерігається у 17-35 % вагітних жінок. У механізмі розвитку дисфункції плаценти лежить спазм судин фетоплацентарного комплексу, що призводить до зниження, а згодом і до порушення матково-плацентарного кровотоку. Дисфункція плаценти призводить до розвитку гіпоксії, затримки розвитку і зростання плоду і надалі впливає на результат вагітності і пологів. У даний час це ускладнення є основною причиною антенатальної загибелі плоду або розвитку дистресу плоду в пологах. Доведено, що дисфункція плаценти найчастіше розвивається на тлі ускладнень вагітності або при наявності у жінки різних екстрагенітальних захворювань, таких як залізодефіцитна анемія [1].

На сьогоднішній день загальновідомо, що оксид азоту, визначений як ендотеліальний фактор релаксації, і є важливим компонентом регуляції тону кровеносних і тону лімфатичних судин, а також попередження тромбоутворення. У процесі вагітності відбувається зростання ендотеліальної вазодилатації. Втім, вже відомо, що найбільш виражені зміни експресії eNOS спостерігаються при наявності сполучення дисфункції плаценти та залізодефіцитної анемії [2].

Найбільш близьким до заявленого технічного рішення є розробка, яка передбачає морфологічне, імуногістохімічне дослідження базальної децидуальної оболонки і ворсинчастого хоріону плаценти визначення індексу експресії маркерів апоптозу p53 і bcl-2 [3].

Недоліком методу є те, що він не враховує стан ендотеліальної дисфункції та є не специфічним для прогнозування дисфункції плаценти у вагітних із залізодефіцитною анемією в анамнезі.

В основу винаходу поставлена задача підвищення ефективності прогнозування дисфункції плаценти у вагітних з залізодефіцитною анемією шляхом проведення імуногістохімічного дослідження експресії eNOS плаценти, що дозволить з високим ступенем вірогідності визначати ризик розвитку дисфункції плаценти при наступних вагітностях.

Поставлена задача вирішується тим, що, згідно з винаходом, визначають експресію ендотеліальної нітроксидсинтази плаценти і при наявності парадоксальної, негативної або різко знижених показників такої у жінок з неускладненим перебігом вагітності визначають високий ризик розвитку дисфункції плаценти при наступних вагітностях.

Спосіб виконується наступним чином.

Поліклональні антитіла (135 кДа) використовують у розведенні 1:50. Фіксовані у формаліні мікропрепарати зразків плацентарної тканини підлягають витримуванню у 10 мМ цитратного буфера при рН 6,0 протягом 10-20 хвилин, після чого препарати витримували при кімнатній температурі протягом 20 хвилин. Як контрольні зразки використовують ендотелій капілярів.

Реакція візуалізується за допомогою набору UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen (Thermo scientific). Мікропрепарати вивчали під мікроскопом "Olympus BX-51" з подальшою обробкою за допомогою програми "Olympus DP-soft v.3.2". При інтерпретації даних зважають на локалізацію експресії за структурами синтицію та його судинних елементів. Інтенсивність експресії оцінювали напівкількісним методом: при відсутності експресії - «-», при сумнівній або парадоксальній експресії - «+», при нормальному рівні експресії «+» (відповідає контрольним значенням), при підвищеній експресії (збільшення щільності позитивних ділянок на 30-50 %) - «++», при гіперекспресії (збільшення позитивних ділянок удвічі) - «+++». При наявності парадоксальної, негативної або різко зниженої експресії у порівнянні з нормою визначається високий ризик розвитку дисфункції плаценти при наступних вагітностях.

Приклад застосування.

Дослідження виконано на клінічних базах кафедри акушерства та гінекології № 1 ОНМедУ (м. Одеса) та патоморфологічного відділення ДУ "ІПАГ НАМНУ" (м. Київ).

Було досліджено плаценти від 30 жінок, які розподілено на 3 групи:

- 1 - плаценти від жінок з фізіологічним перебігом вагітності та пологів - 10 спостережень;
- 2 - плаценти від жінок з анемією вагітних в анамнезі - 10 спостережень;
- 3 - плаценти від жінок з дисфункцією плаценти і анемією в анамнезі - 10 спостережень.

Пацієнтки були відібрані залежно від показників кардіотокографії, доплерометрії матково-плацентарного кровотоку. Критеріями виключення були: багатопліддя, прееклампсія, важка екстрагенітальна патологія пацієнток (цукровий діабет, системні захворювання серцево-судинної, дихальної і травної систем), природжені і спадкові захворювання плоду.

Аналіз імуногістохімічного дослідження NOS у порівняльному аспекті показав наступне: експресія MKAT NOS була виявлена у всіх спостереженнях контрольної групи в цитоплазмі

синцитія ворсинок усіх типів, а також нерівномірно в ендотелії фетальних капілярів і в цитоплазмі ендотелію судин децидуальної оболонки.

У другій групі експресія в структурах плаценти була ідентичною до показників, одержаних у групі контролю (у 70 % випадків - «+», у 10 % - «+»), однак у частині ворсинок відзначалося нерівномірне зниження експресії в синцитії, яка також майже не визначалася в ендотелії капілярів фетальних судин, особливо термінальних та ворсинок середнього калібру.

Представляють інтерес зміни експресії NOS в 3 групі спостережень, де експресія МКАТ NOS була різко підвищена (у 60 % - «+++») фокально в синцитії ворсинок, була відсутня (10 % випадків) чи різко знижена (20 %).

Таким чином, eNOS відіграє важливу роль у функціонуванні плацентарного бар'єру при фізіологічному перебігу вагітності та пологів, оскільки експресується (як показали дослідження) в цитоплазмі синцитія ворсинок і ендотелію фетальних капілярів, а також судин децидуальної оболонки, тобто в найбільш значущих структурах, які приймають участь в обміні речовин між матір'ю і плодом.

Виявлено структурні зміни з нерівномірною експресією eNOS у фетальних капілярах і синцитію, які виражені в II і, особливо, в III групах, що вказує на наявність структурно-функціональних порушень при дисфункції плаценти на тлі анемії, які ведуть до зміни внутрішньоутробного розвитку плоду. У III групі експресія eNOS мала відмінні особливості у порівнянні з II групою, які проявлялися в більш вираженій інтенсивності експресії, що, очевидно, пов'язано з вираженою компенсаторною реакцією на синтропію залізодефіцитної анемії та дисфункції плаценти.

У порівнянні з прототипом, запропонований спосіб, за рахунок оригінального підходу до визначення експресії антитіл к eNOS плаценти у вагітної, дозволяє підвищити точність прогнозування розвитку дисфункції плаценти і призначити своєчасні лікувальні-профілактичні заходи.

Джерела інформації:

1. Tzung K. Hemodynamics and Mechanobiology of Endothelium / K. Tzung K.N.Y. World Scientific Publishing Company; 1 ed. 2010-380 p.

2. Funzione endoteliale quale marker di aterosclerosi subclinica: metodiche di valutazione ed applicazioni cliniche. / Ruggiero D., Paolillo S., Ratta G.D. [et al.] // Monaldi Arch Chest Dis. - 2013- Vol. 80(3) - P. 106-110.

3. Патент RU 2407008 МПК G01N33/48 Способ морфологической диагностики степени тяжести гестоза / Сарыева Ольга Павловна (RU), Мальгина Любовь Юрьевна (RU), Перетятко Любовь Петровна (RU), Панова Ирина Александровна (RU).

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб прогнозування дисфункції плаценти у вагітних з залізодефіцитною анемією шляхом проведення імуногістохімічного її дослідження, який **відрізняється** тим, що визначають експресію ендотеліальної нітроксидсинтази плаценти і при відсутності експресії - "-", при сумнівній або парадоксальній експресії - "±", при підвищеній експресії (збільшення щільності позитивних ділянок на 30-50 %) - "++", при гіперекспресії (збільшення позитивних ділянок удвічі) - "+++" показників експресії eNOS у жінок з неускладненим перебігом вагітності у порівнянні з нормальним рівнем експресії "+" (відповідає контрольним значенням), визначають високий ризик розвитку дисфункції плаценти при наступних вагітностях.