



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **92385** (13) **U**  
(51) МПК (2014.01)  
**A61B 1/00**  
**A61B 5/02** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>u 2014 03090</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Кочерга Зоряна Ростиславівна (UA),</b> <b>Ковальчук Лариса Євгенівна (UA),</b> <b>Макарчук Оксана Михайлівна (UA),</b> <b>Римарчук Мар'яна Михайлівна (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>27.03.2014</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>11.08.2014</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>11.08.2014, Бюл.№ 15</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>Кочерга Зоряна Ростиславівна,</b> вул. Коперніка, 11-а/2, м. Івано-Франківськ, 76006 (UA), <b>Ковальчук Лариса Євгенівна,</b> вул. Коновальця, 121/8, м. Івано-Франківськ, 76014 (UA), <b>Макарчук Оксана Михайлівна,</b> вул. Вербова, 3, с. Чукалівка, Івано- Франківська обл., 76018 (UA), <b>Римарчук Мар'яна Іванівна,</b> вул. Кармелюка, 2/18, м. Івано-Франківськ, 76018 (UA)

**(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ЗАТРИМКИ ВНУТРІШНЬОУТРОБНОГО РОЗВИТКУ ПЛОДА ЗА ПОКАЗНИКАМИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ГЕНОМУ НЕЙТРОФІЛЬНИХ ГРАНУЛОЦИТІВ ПЕРИФЕРІЙНОЇ КРОВІ ВАГІТНИХ ЖІНОК**

**(57) Реферат:**

Спосіб діагностики та прогнозування затримки внутрішньоутробного розвитку плода за показниками функціонального стану геному нейтрофільних гранулоцитів периферійної крові вагітних жінок, включає цитологічне дослідження клітин крові з виявленням в них ядерних структур, причому додатково проводять цитогенетичний аналіз нейтрофільних гранулоцитів периферійної крові вагітних в терміні гестації 20-22 тижні з визначенням індексів хроматизації, статевого хроматину (гетеропікнотичної Х-хромосоми), ядерцевого та патологічних ядер, які відображають порушення імуногенетичного статусу вагітної жінки.

**UA 92385 U**



Корисна модель належить до галузі медицини, а саме до перинатології та неонатології, і може бути використана для визначення спадкової схильності до виникнення затримки внутрішньоутробного розвитку у новонароджених за активністю функціонального стану геному нейтрофільних гранулоцитів периферійної крові вагітних (НГПК).

Плацентарна недостатність і синдром затримки внутрішньоутробного розвитку (ЗВУР) плода є одними з найбільш частих причин порушень адаптації новонароджених в неонатальному періоді, високої перинатальної і малюкової смертності, затримки психомоторного розвитку дітей [Стан системи-мати-плацента-плід при затримці розвитку плода за даними ультразвукового дослідження /С.М. Янюта, О.І. Жданович, Т.В. Коломійченко [та ін.] //Перинатология и педиатрия. - 2008. - № 2 (34). - С. 51-53]. Механізми формування ЗВУР вивчалися багатьма вченими при гестозах вагітних, при цьому була розроблена раціональна акушерська тактика, що дозволило знизити перинатальну смертність [Макаров О.В. Синдром задержки развития плода: современные подходы к фармакотерапии /О.В. Макаров, П.В. Козлов, Д.В. Насырова //Российский вестник акушерства и гинекологии. - 2003. - № 6 - С. 18-22]. У окремих роботах досліджувалися структурні зміни хромосомного апарату дітей зі ЗВУР [Кочерга З.Р. Нестабильность генома у новорожденных с задержкой внутриутробного развития различных экологических районов прикарпатья /З.Р. Кочерга //Фундаментальные исследования. - 2013 - № 9 (6). - С. 40-45]. Однак стабільність геному залежить не лише від структури ДНК, але й від його епігенетичних модифікацій, найбільш вивченими серед яких є метилювання ДНК, модифікації гістонів та стан конденсації хроматину [Лебедев И.Н. Эпигенетические аспекты безопасности вспомогательных репродуктивных технологий /И.Н. Лебедев, В. П. Пузырев //Генетика. - 2007. - Т. 43, № 9. - С. 1157-1171; Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory /A. Bird //Genes Dev. - 2002. - V. 16. - P. 6-21; Коряков Д. Е. Модификации гистонов и регуляция работы хроматина /Д.Е. Коряков //Генетика. - 2006. - Т. 42, № 9. - С. 1170-1185; Управляющая динамика хроматина в ядрах клеток эукариотов, проблема нестабильности хромосом и репарации двойных разрывов ДНК /Д.М. Спитковський, Н.Н. Вейко, О.С. Моисеева [и др.] //Медицинская генетика. - 2005. - Т. 4, № 11. - С. 494-503]. Ступінь компактизації останнього відображає функціональний і структурний аспекти гомеостазу, контролює вибірковість зчитування інформації і детермінує майбутнє клітини [Нейко Є.М. Епігенетичні механізми регуляції активності генів і мультифакторні хвороби /Є.М. Нейко, Л.Є. Ковальчук, Н.В. Чернюк //Галицький лікарський вісник. - 2007. - Т. 14, № 1. - С. 11-14]. Співвідношення активного і неактивного хроматину може відігравати певну роль у формуванні ЗВУР. Для оцінки функції спадкового апарату на організмовому рівні можна використовувати стан конденсації хроматину таких є добре вивчених формених елементів, як нейтрофільні гранулоцити периферійної крові (НГПК) [Тепляков А.И. Топография интерфазного хроматина нейтрофильных гранулоцитов при атеросклерозе: еще одно подтверждение экспрессии генов для завершения ими функциональной программы /А.И. Тепляков //Иммунопатология, аллергология, инфектология. - 2004. - № 2. - С. 108-112].

Найбільш близькими до корисної моделі, що заявляється, є "Спосіб ранньої діагностики функціонального стану геному нейтрофільних гранулоцитів периферійної крові у хворих на хронічне обструктивне захворювання легень" [Патент № 26789 u200704785 Чернюк Н.В., Ковальчук Л.Є, Палійчук І.В. Заявл. 28.04.2007; опуб. 10.10.2007] та "Спосіб діагностики затримки внутрішньоутробного розвитку плода за показниками функціонального стану геному нейтрофільних гранулоцитів периферійної крові новонароджених" [Патент № 62672. МПК А61В10/00 З.Р. Кочерга, Л.Є. Ковальчук. Заявлено 08.02.2011; опубліковано 12.09.2011. - Бюл. № 17. - 6 с.], що включають цитологічне дослідження клітин крові з виявленням в них ядерних структур, при цьому додатково проводять цитогенетичний аналіз НГПК з визначенням індексів хроматизації (співвідношення ядер з перевагою еухроматину до ядер з гетерохроматином), ядерцевого, гетеропікнотичної Х-хромосоми та патологічних ядер. Проте вищезгадані способи не дають змогу прогнозувати ЗВУР на пренатальному етапі розвитку. Недоліком відомих способів є можливість діагностувати нестабільність геному в умовах уже діагностованого ЗВУР новонародженого, проте не дозволяє прогнозувати ініціацію механізмів розвитку даного ускладнення на пренатальному етапі.

Поставлена задача способу визначення спадкової схильності за активністю функціонального стану геному (ФСГ) НГПК, включає цитологічне дослідження клітин крові з виявленням в них ядерних структур, при цьому додатково проводять цитогенетичний аналіз нейтрофільних гранулоцитів крові з визначенням індексів ІХ, СХ, ЯІ, ПЯ. Спосіб діагностики та прогнозування затримки внутрішньоутробного розвитку плода за показниками функціонального стану геному нейтрофільних гранулоцитів периферійної крові вагітних жінок включає цитологічне дослідження клітин крові з виявленням в них ядерних структур, який відрізняється

тим, що додатково проводять цитогенетичний аналіз нейтрофільних гранулоцитів периферійної крові вагітних в терміні гестації 20-22 тижні з визначенням індексів хроматизації, статевого хроматину (гетеропікнотичної Х-хромосоми), ядерцевого та патологічних ядер які відображають порушення імуногенетичного статусу вагітної жінки.

Корисна модель "Спосіб діагностики затримки внутрішньоутробного розвитку плода за показниками функціонального стану геному нейтрофільних гранулоцитів периферійної крові вагітних жінок" шляхом визначення спадкової схильності до виникнення даного ускладнення, вирішується тим, що додатково проводиться лабораторний аналіз мазку крові вагітної жінки в терміні гестації 20-22 тижні, породіллі з метою цитогенетичного дослідження нейтрофільних гранулоцитів з визначенням індексів хроматизації (IX), статевого хроматину (СХ), ядерцевого (ЯІ) та патологічних ядер (ПЯ), які відображають порушення імуногенетичного статусу жінки, генетичну нестабільність і схильність до захворювань.

Для цитогенетичного дослідження проводили забір 0,5 мл периферійної крові, виготовляли мазки крові, які після висушування доставлялись у генетичну лабораторію кафедри медичної біології і медичної генетики. Забарвлення ядер здійснювали за Фьольгеном у відповідній модифікації [Патент № 26789 u200704785 Чернюк Н.В., Ковальчук Л.Є, Палійчук І.В. Заявл. 28.04.2007; опуб. 10.10.2007. Спосіб ранньої діагностики функціонального стану геному нейтрофільних гранулоцитів периферійної крові у хворих на хронічне обструктивне захворювання легень]. Функціональну активність геному встановлювали за морфологічними особливостями інтерфазних ядер НГПК. В ході дослідження проведено комплексний аналіз чотирьох індексів їх каріограми: хроматизації, ядерцевий, гетеропікнотичної Х-хромосоми або статевий хроматин, патологічних ядер. Препарати досліджували методом світлової мікроскопії за допомогою оптико-електронного комплексу Метаскан-2. Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали за допомогою персонального комп'ютера і програми для роботи з електронними таблицями Microsoft Excel. Використовували t-критерій Ст'юдента, реалізований у пакеті "STATISTICA-6". Матеріалом дослідження слугували цитологічні препарати НГПК. Порівняльну ефективність запропонованого способу оцінювали 60 жінок в терміні вагітності 20-22 тижні та на 3 день після пологів. Серед них 36 жінок без акушерсько-гінекологічної патології (група А) та 24 вагітні, у яких діагностовано плацентарну дисфункцію різного ґенезу та синдром ЗВУР плода (група В).

У здорових вагітних жінок у терміні гестації 20-22 тижні відносний показник НГПК серед загальної кількості формених елементів периферійної крові був вищим у 1,19 разу порівняно з таким у породіль, що народили здорових дітей, відповідно ( $44,60 \pm 0,26$ ) і ( $37,17 \pm 1,46$ ) ум. од. Аналогічну тенденцію було відмічено у вагітних жінок, у яких в подальшому було діагностовано синдром ЗВУР, відповідно ( $56,11 \pm 1,80$ ) і ( $53,33 \pm 2,70$ ) ум. од., що, очевидно, пов'язано з імунологічним феноменом самого процесу гестації.

Визначення IX, як найважливішого показника ФСГ довело наявність певних особливостей у жінок з плацентарною дисфункцією та ЗВУР плода. Показник IX, який опосередковано вказує на можливість дерепресії ДНК, був вищим у здорових вагітних жінок без плацентарної дисфункції та патології плода, на противагу до такого у жінок з діагностованим синдромом ЗВУР плода (табл.). У породіль, що народили здорову дитину, IX на 9,01 % був нижчим, ніж у вагітних жінок в терміні гестації 20-22 тижні. У породіль, що народили дитину зі ЗВУР, навпаки, IX переважав на 4,49 % такий у вагітних жінок, у яких діагностовано синдром ЗВУР плода.

Закономірним продовженням дослідження ФСГ був аналіз гетеропікнотичної Х-хромосоми, яка містить локуси регуляції експресії генів [Гвоздев В.А. Гетерохроматин и его функциональные характеристики /В.А. Гвоздев, Л.А. Усакин, Г.Л. Коган //Медицинская генетика. - 2003. - № 7. - С. 290-296]. Навіть незначні зміни СХ у жінок або наявність цього індексу у чоловіків можуть викликати порушення регуляції синтезу необхідної клітині інформаційної РНК. Доведено перевагу СХ у 1,26 разу у вагітних жінок без плацентарної дисфункції та патології плода, порівняно з таким у вагітних з вищезгаданою патологією ( $p < 0,05$ ). Порівняння даного показника у породіль і вагітних жінок виявило тенденцію, подібну до такої щодо IX в досліджуваних групах. У породіль, що народили здорових дітей, СХ нижчий на 6,38 % порівняно з таким у вагітних жінок без патології плода. На противагу, у породіль, що народили дітей із синдромом ЗВУР, СХ був вищим на 4,19 % від аналогічного показника у вагітних з діагностованою патологією плода. Отримані результати опосередковано свідчать порушення першого етапу реалізації спадкової інформації та його регуляції.

Показником синтезу білкової молекули вважається активність ядерцевого апарату, оскільки в ядрах здійснюється транскрипція генів, які кодуєть рибосомні білки [Lachner M. An epigenetic road map for histone lysine methylation /M. Lachner, R.J. O'Sullivan, T. Jenuwein //J. Cell Sci. - 2003. - V. 116. - P. 2117-2124; Newburger P.E. Global analysis of neutrofil gene expression

/P.E. Newburger, Y.V. Subrahmanyam, S.M. Weissman //Cur. Opin. Haematol. - 2000 - № 7. - V.I. - P. 16-20; Sims R.J. Histone lysine methylation; a signature for chromatin function /R.J. Sims, K. Nishioka, D. Reinberg //Trends Genet. - 2003. - V. 19. - P. 2117-2124].

Таблиця

Індекси функціонального стану геному ядер нейтрофільних гранулоцитів периферійної крові вагітних жінок і породіль (А) та з діагностованим синдромом ЗВУР плода (Б)

Індекси функціонального стану ядер нейтрофілів		Вагітні жінки (20-22 тижні), n=60	Породіллі (3-й день після пологів), n=60
хроматизації, ум. од.	А	1,00±0,02	0,91±0,02
	Б	0,85±0,06	0,89±0,01
статевий хроматин, %	А	25,52±0,03	23,89±0,96
	Б	20,12±0,12*	21,00±0,57*
ядерцевий, %	А	4,61±0,24	6,00±0,34
	Б	7,82±0,04*	6,94±0,26*
патологічних ядер, %	А	8,42±0,44	13,35±0,63
	Б	13,84±0,01*	15,56±0,33*

Примітка \* - ступінь вірогідності відмінностей між індексами здорових вагітних та жінок із діагностованою затримкою внутрішньоутробного розвитку плода ( $p < 0,05$ ).

5

Кількість ядерців, їхні розміри і структура відображають метаболічну активність клітин або рівень диференціювання і, відповідно, транскрипцію генів рибосомної РНК. Встановлено, що у вагітних жінок, у яких діагностовано ЗВУР плода, ЯІ був вищим у 1,69 разу в порівнянні з аналогічним показником у вагітних без вищевказаної патології ( $p < 0,05$ ). У породіль, які народили здорових дітей, ЯІ був більшим в 1,31 разу, ніж у вагітних жінок без патології плода. В післяпологовому періоді відмічена тенденція до зниження даного показника (на 11,25 %) у породіль, що народили дітей з синдромом ЗВУР порівняно із вагітними, в терміні гестації 20-22 тижні, у яких діагностовано ЗВУР плода. Даний факт свідчить на користь адекватної реакції клітин на стрес, адаптаційних можливостей спадкового апарату породіль.

10

15

Вивченням індексу патологічних ядер у вагітних жінок у терміні 20-22 тижнів гестації з діагностованим ЗВУР плода показано їх перевагу в 1,64 рази, в порівнянні з таким у вагітних без патології плода ( $p < 0,05$ ). ПЯ у вагітних в терміні 20-22 тижні був меншим, ніж після народження ними здорових дітей у 1,58 рази. Дана тенденція в сторону збільшення спостерігалась і в післяродовому періоді. Оскільки ФСГ залежить і від стану каріолеми, з якою з'єднується ДНК хроматину для наступної деспіралізації, морфологічні зміни компонентів ядра впливають на конденсацію хроматину і транскрипцію. Отже, зростання ПЯ у породіль, що народили дитину з синдромом ЗВУР, порівняно зі здоровими жінками, було закономірним.

20

25

Таким чином, комплекс досліджуваних індексів інтерфазних ядер НГПК об'єктивно відображає особливості ФСГ вагітних і породіль. Виявлені нами зміни ФСГ НГПК засвідчили єдність генетичних та епігенетичних механізмів контролю структурного і функціонального аспектів гомеостазу в процесі росту і розвитку дитячого організму, що лягло в основу запропонованої моделі.

30

Запропонована корисна модель, яка дозволяє об'єктивно відобразити особливості функціонального стану спадкового апарату вагітних, породіль та за комплексом каріологічних показників інтерфазних ядер НГПК, які можуть бути запропоновані в акушерській практиці як генетичні маркери прогнозування плацентарної дисфункції та ЗВУР плода.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

35

Спосіб діагностики та прогнозування затримки внутрішньоутробного розвитку плода за показниками функціонального стану геному нейтрофільних гранулоцитів периферійної крові вагітних жінок, включає цитологічне дослідження клітин крові з виявленням в них ядерних структур, який **відрізняється** тим, що додатково проводять цитогенетичний аналіз нейтрофільних гранулоцитів периферійної крові вагітних в терміні гестації 20-22 тижні з визначенням індексів хроматизації, статевого хроматину (гетеропікнотичної Х-хромосоми), ядерцевого та патологічних ядер, які відображають порушення імуногенетичного статусу вагітної жінки.

40

---

Комп'ютерна верстка М. Мацело

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601