



УКРАЇНА

(19) UA (11) 57874 (13) U  
(51) МПК  
G01N 33/52 (2011.01)  
G01N 33/53 (2011.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

### (54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ІНДИВІДУАЛЬНОЇ СХИЛЬНОСТІ ДО ПЕРЕБІГУ ПРЕЕКЛАМПСІЇ

1

(21) u201011775  
(22) 04.10.2010  
(24) 10.03.2011  
(46) 10.03.2011, Бюл.№ 5, 2011 р.  
(72) ЛОСКУТОВА ТЕТЯНА ОЛЕКСАНДРІВНА, ВО-  
РОНІН КОРНЕЛІЙ ВАЛЕНТИНОВИЧ  
(73) ЛОСКУТОВА ТЕТЯНА ОЛЕКСАНДРІВНА  
(57) Спосіб прогнозування індивідуальної схильності до перебігу пreeкламписії, що включає тестування ДНК на наявність поліморфізму гена параоксонази 1 Gln192Arg та визначення алельних варіантів гена параоксонази 1 Gln192Arg методом полімеразної ланцюгової реакції, який відрізня-

2

ється тим, що одночасно визначають коефіцієнт атерогенності та коефіцієнт АОС-ПОЛ, що відображає інтегральну оцінку процесів антиоксидантної системи та перекисного окислення ліпідів, і, при наявності генотипу Arg192Arg, коефіцієнта атерогенності  $\geq 2,8$  та коефіцієнта АОС-ПОЛ  $< 1,3$  прогнозують перебіг пreeкламписії середнього або тяжкого ступеня, а при наявності генотипу Gln192Arg, коефіцієнта атерогенності  $\geq 2,8$  та коефіцієнта АОС-ПОЛ  $< 1,3$  прогнозують перебіг пreeкламписії легкого ступеня.

Корисна модель відноситься до медицини, а саме до акушерства, і може бути використана для прогнозування індивідуальної схильності до перебігу пreeкламписії у вагітних.

Пreeкламписія, як патологічний стан, ще» виникає під час вагітності, й супроводжується порушеннями різних функцій організму, ускладнює плин приблизно 20-25 % усіх вагітностей (Ramin K.D. The prevention and management of eclampsia // Obstetrics and Gyn ecology Clinics. 1999, v.26, № 3, p.490). Актуальність розробки способу визначається тим, що пreeкламписія різного ступеня тяжкості зустрічається у 10-21 % вагітних і залишається провідною причиною материнської та перинатальної захворюваності та смертності. Відсутні чіткі критерії діагностики по ступеням тяжкості, що не дозволяє визначити варіант перебігу захворювання, розробити на підставі цього акушерську тактику і визначити термін пролонгації та розродження.

Відомий спосіб оцінки важкості пreeкламписії за допомогою визначення наявності й концентрації циркулюючих імунних комплексів антифосфоліпідних антитіл з IgG (Макацарія А.Д., Бицадзе В.О. Тромбофилические состояния в акушерской практике. Научное издание, М.: РУССО, 2001, с.351-369). Недоліком даного способу є виявлення високого титру антифосфоліпідних антитіл лише в од-

ній третині жінок із пreeкламписією, відсутність строгої стандартизації, що дозволяє оцінити ступінь важкості й прогнозувати плин пreeкламписії.

Найбільш близьким з технічної сутності та результату, що досягається, є спосіб прогнозування індивідуальної схильності до перебігу пreeкламписії за допомогою визначення активності параоксонази 1, як фактора ризику негативних наслідків захворювань (МЗ № WO2009105622, МПК A61B5/145, A61B5/145, опубл. 27.08.2009), що містить тестування ДНК на наявність поліморфізму гена параоксонази 1 Gln192Arg, та визначення алельних варіантів гена параоксонази 1 Gln192Arg,

Даний показник обраний у зв'язку з тим, що у разі низької активності параоксонази 1 (PON 1) збільшується ризик розвитку серцево-судинних захворювань. Параоксоназа 1 володіє антиоксидантними і антиатерогенними властивостями: перешкоджає окисленню ліпідів у ліпопротеїдах низької щільності шляхом їх гідролізу, диференціюванню моноцитів в макрофаги, захопленню макрофагами окислених ЛП ІКТЦ (ліпопротеїдів високої щільності) і перетворенню макрофагів в ліністі клітини. Активність параоксонази 1 залежить від її генотипу. Носії мутантної гомозиготи параксонази 1 Arg192Arg мають знижену активність параоксонази 1, що призводить до його низь-

UA (11) 57874 (13) U

кої продуктивності і збільшує ризик серцево-судинних захворювань.

Однак недоліком є те, що пропонується тільки для визначення ризику серцево-судинних захворювань (атеросклероз, ішемічна хвороба серця, церебро-васкулярна хвороба, хвороби периферичних судин). Відомо, що в патогенезі прееклампсії лежать процеси, подібні до атеросклерозу, збільшується кількість загального холестерину та ЛПВЩ (ліпопротеїдів високої щільності), активізуються процеси перекисного окислення ліпідів, відбувається недостатність антиоксидантного захисту. Відомий спосіб не враховує стан антиоксидантної системи та процесів перекисного окислення ліпідів, не дає можливість оцінити індивідуальну схильність до перебігу прееклампсії у вагітних по ступенях важкості.

В основу корисної моделі покладено завдання прогнозування індивідуальної схильності до перебігу прееклампсії у вагітних за рахунок оцінки індивідуальної схильності шляхом врахування стану антиоксидантної системи та процесів перекисного окислення ліпідів, що забезпечують прогнозування результату захворювання по ступеням важкості, визначення тактики лікування, терміну можливого продовження вагітності, зниження материнської і перинатальної захворюваності і смертності.

Поставлена задача досягається тим, що в способі прогнозування індивідуальної схильності до перебігу прееклампсії, що включає тестування ДНК на наявність поліморфізму гена параоксонази 1 Gln192Arg, та визначення алельних варіантів гена параоксонази 1 Gln192Arg методом полімеразної ланцюгової реакції, відповідно корисній моделі, одночасно визначають коефіцієнт атерогенності та коефіцієнт АОС-ПОЛ, що відображає інтегральну оцінку процесів антиоксидантної системи та перекисного окислення ліпідів, і при наявності генотипу Arg192Arg, коефіцієнта атерогенності  $\geq 2,8$  та коефіцієнта АОС-ПОЛ  $< 1,3$  прогнозують перебіг прееклампсії середнього або тяжкого ступеня, а при наявності генотипу Gln192Arg, коефіцієнта атерогенності  $\geq 2,8$  та коефіцієнта АОС-ПОЛ  $> 1,3$  прогнозують перебіг прееклампсії легкого ступеня.

Перевагою є те, що в пропонованому способі включене дослідження поліморфізму гена параоксонази 1, яке є суцільно індивідуальним, специфічним і незалежним від впливу різних факторів, визначення коефіцієнту атерогенності та стану перекисного окислення ліпідів, антиоксидантної системи саме у вагітних що дозволить прогнозувати перебіг прееклампсії, визначити тактику лікування і термін можливого пролонгування вагітності, зниження материнської та перинатальної захворюваності та смертності.

На сучасному етапі відомо, що можливою причиною виникнення і розвитку оксидативного стресу є мутація ферменту параоксонази 1 (PON1) Gln192Arg. Параоксоназа 1 (PON1) володіє антиоксидантними і антиатерогенними властивостями: перешкоджає окисленню ліпідів у ліпопротеїдах низької щільності шляхом їх гідролізу, диференціюванню моноцитів в макрофаги, захопленню мак-

рофагами окислених ЛПНЩ (ліпопротеїдів високої щільності) і перетворенню макрофагів в піністі клітини. Знижена каталітична активність параоксонази 1, зумовлена як генетичними, так і токсичними впливами навколишнього середовища, може призводити до посиленого перекисного окислення ліпідів і пошкодження ендотелію. Наявність мутації в гені параоксонази 1 Gln192Arg призводить до його низької продуктивності і може бути маркером в діагностиці індивідуальної схильності до перебігу прееклампсії у вагітних.

Запропонований спосіб, дозволить визначити можливий варіант перебігу захворювання, пильніше стежити за станом жінки та провести розродження вчасно, що попередить розвиток таких акушерських ускладнень як антенатальна загибель плода, передчасне відшарування нормально розташованої плаценти, еклампсія та інше.

Спосіб прогнозування індивідуальної схильності до перебігу прееклампсії шляхом оцінки індивідуальної схильності до перебігу прееклампсії заключається в тому, що вагітній жінці з прееклампсією проводиться визначення алельних варіантів гена параоксонази 1 Gln192Arg. Це дослідження проводили за допомогою алельспецифічної полімеразної ланцюгової реакції, з подальшою детекцією методом електрофорезу в 3 % агарозному гелі. Використовувався комплект реагентів «SNP-експрес» виробництва НВФ "Літех" (Росія). Геномна ДНК виділялася за допомогою реагенту "ДНК-експрес-кров". Визначення концентрації загального холестерину (ЗХС), холестерину ліпопротеїдів високої щільності (ХСЛГТВЩ), холестерину ліпопротеїдів низької щільності (ХСЛПНЩ), тригліцеридів (ТГ) проводилося в автоматичному режимі на аналізаторі «Biochemistry Analyzer 88». Коефіцієнт атерогенності (КА) розраховували за формулою:  $КА = (ЗХС - ХСЛПВЩ) / ХСЛПВЩ$ . Стан антиоксидантної системи оцінювали за активністю каталази в сироватці крові та активності супероксиддисмутази (СОД). Інтенсивність окислювальних процесів оцінювали за вмістом ТБК-активних продуктів. Інтегральну оцінку процесів антиоксидантної системи та перекисного окислення ліпідів проводили розраховуючи коефіцієнт АОС-ПОЛ =  $(СОД / ТБК)$  каталаза.

При розробці запропонованого способу оцінки індивідуальної схильності к перебігу прееклампсії нами було обстежено три групи пацієнток, які були рандомізовані за віком та особливостями акушерсько-гінекологічного і соматичного анамнезу. Першу групу склали (23 вагітні) вагітні з гестаційною артеріальною гіпертензією та прееклампсією легкого ступеня, другу групу (16 вагітних) з прееклампсією середнього та важкого ступеня, контрольну (К) групу 26 здорових вагітних. У результаті проведеного дослідження було виявлено, що частота генотипу Arg192Arg у вагітних II-ї групи зустрічалася частіше, ніж у контрольній і становила 56,3 % і 34,6 % відповідно ( $\chi^2 = 3,87$ ,  $p = 0,03$ ), а у вагітних I-ї групи не відрізнялася від контролю і становила 21,8 %. Частота гетерозиготних форм Gln192Arg частіше відзначалася в I-й групі (39,1 %), ніж в контрольній (26,9 %), а у II-й групі не відрізнялася від контролю (25 %). Аналіз ліпідних показників

виявив достовірне збільшення рівня тригліцеридів, загального холестерину, ХС ЛПНЩ, коефіцієнта атерогенності у вагітних II-ї групи. Підвищений рівень ТГ, ХС ЛПНЩ відіграє важливу роль в патолофізіології прееклампсії, так як вони здатні пошкоджувати ендотеліальні клітини, що викликає зниження продукції простагліцину, активацію всіх компонентів зовнішнього шляху згортання крові, що асоціюється з гіперкоагуляцією, гіперагрегацією тромбоцитів і вазоконстрикцією. Гіпертригліцеридемія, гіперліпідемія, на тлі порушеної функції параоксонази 1 є доброю мішенню для окислювальних реакцій з формуванням окислювального стресу. Результати дослідження показників АОС-ПОЛ показали, що при прогресуванні захворювання достовірно збільшується вміст ТБК-активних продуктів:  $80,9 \pm 3$  мкмоль/л у вагітних I-ї групи проти  $42,1 \pm 6,3$  мкмоль/л у здорових вагітних ( $p < 0,05$ ). Одночасно з активацією окислювальних процесів настає зниження антиоксидантної активності крові, про що свідчить знижена активність каталази та супероксиддисмутази. Причому у вагітних I-ї групи відзначається підвищення активності каталази на 62,1% в порівнянні зі здоровими вагітними, що може свідчити про активацію і напругу АОС, так як у цієї групи рівень ТБК-активних продуктів не відрізняється від параметрів здорових вагітних. Відзначається зниження активності СОД у I-ї групі на 33,4 %, у II-ї групі на 23 % у порівнянні зі здоровими вагітними. Дисбаланс процесів ПОЛ-АОС впливає на захисну функцію ендотелію: антиагрегантну і антикоагулянтну. Нами була зроблена спроба визначити ризик розвитку прееклампсії при наявності того чи іншого поліморфізму параоксонази 1 в поєднанні з підвищеним коефіцієнтом атерогенності (вище значення контрольної групи), зниженим коефіцієнтом АОС-ПОЛ (менше значення контрольної групи). Ризик розвитку прееклампсії середнього і важкого ступеня у носіїв генотипу Arg192Arg збільшується в 2,43 рази (95 % ДІ (довірчий інтервал) 0,67-3,07), в порівнянні з носіями генотипу Gln192Arg і Gln192Gln. Таким чином, наявність генотипу Arg192Arg є одним з факторів ризику виникнення і перебігу прееклампсії в більш важкій формі. Було встановлено, що за наявності гомозиготної форми Arg192Arg, коефіцієнта атерогенності  $\geq 2,8$ , коефіцієнта АОС-ПОЛ  $< 1,3$  ризик виникнення прееклампсії середнього і важкого ступеня збільшується в 15 раз (95 % ДІ 1,55-71,45). Ризик розвитку прееклампсії легкого ступеня при коефіцієнті атерогенності  $\geq 2,8$ , коефіцієнті АОС-ПОЛ менше 1,3 і гомозиготній формі Arg192Arg збільшується в 3,75 рази (95 % ДІ 0,39-21,43).

Порівняння ризику розвитку прееклампсії середнього або важкого ступеня з ризиком розвитку прееклампсії легкого ступеня при наявності гомозиготної форми Arg192Arg, коефіцієнта атерогенності  $\geq 2,8$  і коефіцієнта АОС-ПОЛ  $< 1,3$  показало, що він більше в 4 рази (95 % ДІ 0,82- 19,42), тому саме він був обраний для оцінювання схильності до розвитку прееклампсії середнього чи важкого ступеня.

При наявності генотипу Gln192Arg або Gln192Gln, коефіцієнта атерогенності  $< 1,3$ , коефіцієнта АОС-ПОЛ  $< 1,3$  ризик розвитку прееклампсії легкого ступеня збільшується в 4 рази (95 % ДІ 1,1-17,65), а при прееклампсії важкого ступеня такої комбінації не було.

Таким чином, проведене дослідження показало, що одночасне тестування ДНК на наявність поліморфізму гена параоксонази 1 Gln192Arg, коефіцієнта атерогенності і коефіцієнту АОС-ПОЛ, може бути корисним для оцінки індивідуальної схильності до перебігу прееклампсії.

Сутність способу, що заявляється пояснюється наступними прикладами.

Приклад 1. Вагітна П., 26 років, історії пологів №47. Дана вагітність друга, перша в 2008 році заворилася на 8 тижні. Вагітність протікала з явищами загрози переривання. Вагітна поступила у відділення патології вагітних з діагнозом: Друга вагітність, 32 тижні, головне передлежання. Прееклампсія легкого ступеня. Артеріальний тиск при надходженні 130/90 мм.рт.ст., протеїнурія разова 0,365г/л, набряки на нижніх кінцівках. При обстеженні способом, що заявляється в терміні 32 тижні вагітності було встановлено наявність патологічної гомозиготи параоксонази 1 Arg192Arg, коефіцієнт атерогенності 2,8, коефіцієнт АОС-ПОЛ 0,01, що належить критеріям, що заявляються та передбачає перебіг прееклампсії середнього або важкого ступеня. Під час перебування у відділенні вагітна отримувала лікування згідно з клінічним протоколом МОЗ України №676, але її стан погіршувався: збільшились набряки, протеїнурія, тиск на рівні 140/90 тримався на максимальних дозах гіпотензивних засобів, при УЗД була діагностована затримка внутрішньоутробного розвитку плода з відставанням в 2 тижні. В 37 тижнів відбулися пологи. Новонароджений мав вагу 2860 г, зріст 49 см та оцінку за шкалою Апгар 6-7 балів. Діагноз заключний: 1 термінові пологи в 37 тижнів, головному передлежанні.

Прееклампсія середнього ступеня важкості. Асиметрична затримка внутрішньоутробного розвитку плода. Висновок: прогноз по способу, що заявляється підтвердився.

Приклад 2. Вагітна С, 39 років, історії пологів №263. Дана вагітність дев'ята. В анамнезі п'ять пологів в строк, одні передчасні пологи, один пізній самоаборт, один медичний аборт. Вагітна поступила у відділення патології вагітних з діагнозом: Дев'ята вагітність, 33 тижні, головне передлежання. Гестаційна гіпертензія та гестаційні набряки. При обстеженні способом, що заявляється в терміні 33 тижні вагітності було встановлено наявність нормальної гомозиготи параоксонази 1 Gln192Gln, коефіцієнта атерогенності 2,8, коефіцієнта АОС-ПОЛ 4,26, що належить критеріям, що заявляються та передбачає перебіг прееклампсії легкого ступеня. Під час перебування у відділенні вагітна отримувала лікування згідно з клінічним протоколом МОЗ України №676 і через 10 днів була виписана до дому у стабільному стані. В 38 відбулися термінові пологи. Новонароджений мав вагу 3870 г, зріст 54 см, оцінка за шкалою Апгар 7-8 балів.

Діагноз заключний: 7 термінові пологи в 38 тижнів, головному передлежанні. Гестаційна артеріальна гіпертензія та гестаційні набряки. Висновок: прогноз по способу, що заявляється підтвердився.

Спосіб, що заявляється, дозволяє визначати своєчасну тактику лікування і термін можливого

продовження вагітності, профілактику розвитку акушерських ускладнень та призведе до зниження материнської та перинатальної захворюваності та смертності.