



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **90073** (13) **U**
(51) МПК (2014.01)
A61B 10/00
G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 14644	(72) Винахідник(и): Горовенко Наталія Григорівна (UA), Россоха Зоя Іванівна (UA), Кир'яченко Світлана Петрівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 16.12.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 12.05.2014	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ГЕНЕТИЧНОЇ ТА РЕГЕНЕРАТИВНОЇ МЕДИЦИНИ НАМН УКРАЇНИ", вул. Вишгородська, 67, м. Київ, 04114 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 12.05.2014, Бюл.№ 9	

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ СТАНУ СЕРЦЕВО-СУДИННОЇ ТА ДИХАЛЬНОЇ СИСТЕМ У НОВОНАРОДЖЕНИХ

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування стану серцево-судинної та дихальної систем у новонародженої дитини включає визначення метаболічних змін функціонального характеру у новонароджених. Здійснюють молекулярно-генетичне дослідження поліморфних варіантів генів ACE, TNF-а, MTHFR і при наявності генотипу DD за геном ACE, генотипу 308AA за геном TNF-а та генотипів 677CT, 677TT за геном MTHFR прогнозують погіршення стану серцево-судинної та дихальної систем з потребою у застосуванні тривалих реанімаційних заходів, штучної вентиляції легень.

U
90073
UA

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме до медичної генетики та неонатології, і може бути використана у практиці для визначення спадкових факторів у розвитку стану серцево-судинної та дихальної системи у новонароджених.

Визначення генетичної детермінанти при прогнозуванні потреби в медичних втручаннях у новонароджених може слугувати основою для розробки індивідуалізованого підходу до вибору стратегії лікування, що буде сприяти зниженню частоти розвитку ускладнень та своєчасній профілактиці небажаних супутніх реакцій. У практичній та науковій медицині відсутні дані про інформативні прогностичні маркери в оцінці ризику розвитку важких критичних станів у новонароджених, які б могли також використовуватися для оптимізації індивідуалізованого прогнозу при виборі протоколу лікування.

Серед відомих способів прогнозування стану серцево-судинної системи у новонароджених дітей слід відмітити визначення в першу добу життя фракції пептиду "N-кінцевого фрагменту" рівня NT-pro-BNP в сироватці крові новонароджених з групи високого перинатального ризику. Наявність в сироватці крові рівня NT-pro-BNP більше 2465 фмоль/мл свідчить про важкий ступінь органічних та функціональних порушень серцево-судинної системи у новонароджених, що дозволяє призначити патогенетичну терапію в ранній термін [1] та спосіб, який реалізується в першу добу життя новонародженої дитини, яка знаходиться в критичному стані визначенням параметрів газорозрядної візуалізації сечі [2], а також спосіб прогнозування порушень механіки дихання у новонароджених дітей шляхом визначення стравохідного тиску після народження дитини, через одну, дві чи три години життя [3].

Недоліками запропонованих способів є те, що вони дозволяють прогнозувати стан серцево-судинної та дихальної систем після появи функціональних розладів, або перших клінічних проявів та відхилень у стані здоров'я у новонароджених.

Найбільш близьким до запропонованого, а тому прийнятий нами за прототип є спосіб прогнозування стану новонародженої дитини, що включає проведення визначення активності сукцинатдегідрогенази (СДГ) та альфа-гліцерофосфатдегідрогенази (а-ГФДГ) у вагітної жінки за 1-3 доби до пологів для прогнозування розвитку метаболічних змін функціонального характеру, що можуть проявитись у новонародженої дитини не відразу після народження, а при а при появі тяжких клінічних проявів захворювання, що можуть бути незворотними [4].

Серед недоліків вибраного прототипу є відсутність можливості прогнозувати стан серцево-судинної та дихальної систем у новонароджених на першому тижні життя. Також недоліком прототипу є те, що програма обстеження не враховує спадкову схильність до розвитку критичних станів та відхилень в ранньому неонатальному періоді.

В основу корисної моделі покладено завдання розробити спосіб прогнозування стану серцево-судинної та дихальної систем у новонароджених шляхом дослідження поліморфних варіантів генів, що дозволить прогнозувати спадкову схильність до розвитку критичних станів та відхилень в ранньому неонатальному періоді, які вимагатимуть тривалих реанімаційних заходів та штучної вентиляції легень.

Поставлена задача досягається за рахунок того, що у відомому способі, який включає визначення метаболічних змін функціонального характеру у новонароджених, згідно з даною корисною моделлю, здійснюють молекулярно-генетичне дослідження поліморфних варіантів генів ACE, TNF-а, MTHFR і при наявності генотипу DD за геном ACE, генотипу 308AA за геном TNF-а та генотипів 677CT, 677TT за геном MTHFR прогнозують погіршення стану серцево-судинної та дихальної систем.

Причинами, які перешкоджають досягненню очікуваного технічного результату за прототипом, є відсутність визначення спадкової схильності до розвитку критичних станів і своєчасного надання медичних заходів, адже основою способу є визначення активності сукцинатдегідрогенази (СДГ) та альфа-гліцерофосфатдегідрогенази (а-ГФДГ) у вагітної жінки, яка має цінність, як діагностичний критерій, лише для визначення метаболічних змін функціонального характеру, що можуть проявитись у новонародженої дитини не відразу після народження, а при появі тяжких клінічних проявів захворювання, що можуть бути незворотними.

Спосіб здійснюється таким чином:

У новонароджених від матерів з обтяженим перебігом вагітності та пологів проводиться молекулярно-генетичне дослідження поліморфних варіантів генів ACE, TNF-а, MTHFR.

Для проведення молекулярно-генетичних досліджень використовується біологічний матеріал, а саме, периферійна кров, що зберігається в закритих системах з ЕДТА при температурі -20 °С.

Виділення ДНК здійснюють за стандартним методом з використанням комерційної тест-системи "ДНК-сорб-В" (ЦНДІ Епідеміології Міністерства охорони здоров'я РФ). Отриманий супернатант містить очищену ДНК.

Для визначення I/D поліморфізму гена ACE застосовують алельспецифічну ПЛР з використанням модифікованого протоколу з олігонуклеотидними праймерами, запропонованими у роботах Lechin M. [5]. Для дослідження C677T поліморфізму гена MTHFR [6], поліморфізму G308A гена TNF-а [7] застосовують метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з наступним аналізом поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ). Продукти ампліфікації фрагментів ДНК генів MTHFR, TNF-а підлягають гідролітичному розщепленню за допомогою ендонуклеаз рестрикції HinfI та NcoI, відповідно. Рестрикцію проводять в мікротермостаті при температурі 37 °С протягом 12 годин та зупиняють, підвищуючи на 20 хвилин до температури 65 °С. Результати ПДРФ аналізу враховують, проводячи електрофорез отриманих фрагментів в 2 % агарозному гелі з додаванням бромистого етидію та з подальшою візуалізацією за допомогою комп'ютерної системи Vitran. Після отримання результатів генотипування прогнозують стан серцево-судинної та дихальної системи у новонароджених.

Запропонованим способом було обстежено 245 новонароджених з критичними станами, госпіталізованих у спеціалізовані відділення неонатального центру НДСЛ "Охматдит" міста Києва та Полтавського міського клінічного пологового будинку і 110 клінічно здорових новонароджених, які народилися у фізіологічних пологах з оцінкою по шкалі Апгар 7-8 балів.

Результати було проаналізовано з використанням пакету статистичних програм Statistica 6.0. Для визначення вірогідності різниці частот генотипів в групах, що порівнювались використовували стандартний критерій χ^2 -квадрат. Відношення шансів Odds Ratio (OR) оцінювалось для розрахунку відносного ризику розвитку хвороби для кожного генотипу. Для всіх видів аналізу статистично значимими вважали значення $p < 0,05$.

У новонароджених, що потребували реанімаційної допомоги та штучної вентиляції легень (ШВЛ), спостерігалось вірогідне підвищення частоти генотипу DD за геном ACE, генотипу 308AA за геном TNF-а, генотипів CT, TT за геном MTHFR ($p < 0,05$) на відміну від їх частоти у хворих новонароджених, які не потребували вище згаданих медичних втручань (таблиця 1). При оцінці тривалості реанімаційних втручань та ШВЛ у обстежених нами хворих новонароджених в залежності від генетичного поліморфізму (таблиця 2) було встановлено, що носії генотипів ID, DD за геном ACE, генотип AA за геном TNF-а, генотипів CT, TT за геном MTHFR достовірно частіше потребували тривалої реанімації та ШВЛ на відміну від носіїв інших генотипів за цими генами (таблиця 2).

Приклад

Новонароджений Б., народився недоношеним, у гестаційному віці 34 тижні, з оцінкою по шкалі Апгар 4 бали, від другої вагітності, у других передчасних пологах з вагою 1770 грам, з ростом 42 см. У матері акушерсько-гінекологічний анамнез неускладнений, екстрагенітальної патології та інфекційних захворювань в анамнезі та під час вагітності не виявлено. Матері 27 років, працює продавцем. У дитини в ранньому неонатальному періоді діагностовано важке перинатальне гіпоксичне ушкодження з розвитком гіпоксично-ішемічного ураження ЦНС, набряк головного мозку, респіраторний дистрес-синдром, дихальна недостатність, некротичний ентероколіт, гостра ниркова недостатність, при електрокардіографічному дослідженні: метаболічні порушення міокарда, порушення фази реполяризації шлуночків, синусова брадикардія. Тривалість перебування у стаціонарі складала 78 діб, з них в реанімаційному відділенні -49 діб, а необхідність застосування штучної вентиляції легень - 42 доби. У 2 місяці 17 днів виписаний додому у задовільному стані. При молекулярно-генетичному дослідженні у хлопчика встановлено комбінацію генотипу DD гена ACE, генотипу AA гена TNF-а та генотипу TT гена MTHFR. При наявності комбінації цих поліморфних варіантів генів значно підвищувався ризик розвитку критичних станів, що потребувало застосування тривалих медичних заходів.

Технічним результатом, що досягається запропонованим способом є прогнозування стану серцево-судинної та дихальної систем у новонароджених з перинатальними факторами ризику, що дозволяє провести обстеження в перші дві доби після народження (ще до виникнення перших клінічних симптомів).

Таблиця 1

Результати статистичного аналізу щодо відмінностей у частотах генотипів в залежності від потреби у медичних втручаннях

Потреба у медичних втручаннях	ACE		TNF-а		MTHFR	
	ID	DD	AG	AA	CT	TT
реанімація	>0,05	<0,05	>0,05	<0,05	<0,05	<0,05
ШВЛ	>0,05	<0,05	>0,05	<0,05	>0,05	<0,05

Таблиця 2

Тривалість реанімаційних заходів та ШВЛ у хворих новонароджених
в залежності від генетичної характеристики

Тривалість медичних втручань	ACE			TNF-α			MTHFR		
	II	ID	DD	GG	AG	AA	CC	CT	TT
реанімація	19,06±3,23	30,40±2,88*	30,62±3,76*	25,51±2,20	31,61±3,95	43,60±8,96*	20,74±2,84	30,91±3,46*	31,24±4,29*
ШВЛ	9,50±2,23	14,45±2,78	16,63±2,87*	8,25±1,72	11,83±1,66	19,50±3,93*	7,80±1,01	14,05±1,87*	16,58±1,02*

Джерела інформації:

1. Патент № 2363000, RU, МПК G01N 33/68. Спосіб діагностики ступеня порушення функції серцево-судинної системи у новонароджених з групи високого перинатального ризику. Писарева А.А., Бережанська С.Б., Каушанська О.Я. - 2007129855/15; Заявл. 03.08.2007; Опубл. 10.09.2009, Бюл. № 21.
2. Патент № 2271005, RU, МПК G01N 33/493. Спосіб прогнозування результатів критичних станів у новонароджених дітей. Бороніна І.В., Неретіна А.Ф., Пашков А.Н., Попова І.М. - 2004121386/15; Заявл. 12.07.2004; Опубл. 27.02.2006, Бюл. № 6.
3. Патент № 2405428, RU, МПК, A61B 5/08. Спосіб визначення порушень механіки дихання у новонароджених дітей. Біченев Р.Г., Елоєв А.О. - 2009117981/14; Заявл. 12.05.2009; Опубл. 10.12.2010, Бюл. 34.
4. Прототип № 2265850, RU, МПК G01N 33/68. Спосіб прогнозування стану новонароджених дітей. Синчихин С.П., Черкасов Н.С., Коколіна В.Ф. - 2003138181/15; Заявл. 31.12.2003; Опубл. 10.12.2005, Бюл. 34.
5. Lechin M. Angiotensin-I Converting Enzyme Genotypes and Left Ventricular Hypertrophy in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy / M. Lechin, M. Quinones, A. Omran [et al.] // Circulation.- 1995. - Vol. 92. - P. 1808-1812.
6. Ming-Yii Huang. MTHFR//Pediatrics.-2006. - Vol. 117, № 5. - P. 1669-1672.
7. Yucelou B. Association of Tumor Necrosis Factor-α and Interleukin-1 Gene polymorphisms with Silicosis / B.Yucelou, V.Vallyathan, D.P. Landsittel // Toxicology and Applied pharmacology.-2001. - Vol. 172. - P. 75-82.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- Спосіб прогнозування стану серцево-судинної та дихальної систем у новонародженої дитини, що включає визначення метаболічних змін функціонального характеру у новонароджених, який **відрізняється** тим, що здійснюють молекулярно-генетичне дослідження поліморфних варіантів генів ACE, TNF-α, MTHFR і при наявності генотипу DD за геном ACE, генотипу 308AA за геном TNF-α та генотипів 677CT, 677TT за геном MTHFR прогнозують погіршення стану серцево-судинної та дихальної систем з потребою у застосуванні тривалих реанімаційних заходів, штучної вентиляції легень.

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

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