



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **97446**

(13) **U**

(51) МПК

G01N 33/49 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 11740**

(22) Дата подання заявки: **30.10.2014**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.03.2015**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.03.2015, Бюл.№ 5**

(72) Винахідник(и):

**Давиденко Наталія Василівна (UA),
Лоскутова Тетяна Олександрівна (UA),
Воронін Корнелій Валентинович (UA)**

(73) Власник(и):

**Давиденко Наталія Василівна,
пров. Штабний, 8, кв. 98, м.
Дніпропетровськ, 49100 (UA)**

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ НЕВИНОШУВАННЯ ВАГІТНОСТІ

(57) Реферат:

Спосіб діагностики невиношування вагітності включає одночасне тестування ДНК на наявність поліморфізму гена фолатного обміну - метилентетрагідрофолатредуктази (MTHFR) - C677T. Додатково визначають маркери генетичної тромбофілії, а саме: мутації 1691 G→A в гені фактора V Leiden, мутації 20210 G→A в гені протромбіну, поліморфізм 455 G→A в гені фібриногену В.

UA 97446 U

Корисна модель належить до галузі медицини, зокрема акушерства та гінекології, і стосується діагностики генетичних форм тромбофілії у вагітних з невиношуванням.

Невиношування вагітності є актуальною проблемою сучасного акушерства та гінекології й спричиняє не тільки демографічні втрати, але й порушує репродуктивне, соціальне і психологічне благополуччя жінки.

В даний час немає єдиного погляду на місце генетичної тромбофілії у розвитку невиношування, що може бути пов'язано з різною етнічною приналежністю, з тим різновидом генних поліморфізмів, дослідження яких проводилося. В акушерській практиці тести, які свідчать про наявність тромбофілії стали одночасно маркерами високого ризику невиношування, гестозу, відшарування нормально розташованої плаценти

Відомий спосіб прогнозування перебігу вагітності у жінок з невиношуванням та тромбофілією [Патент РФ № 2429478, МПК G01N 33/49, опубл. 20.09.2011], при якому проводять визначення фібринолітичної активності, активованого часткового тромбoplastинового часу, продуктів деградації фібрину та міжнародного нормалізованого відношення з подальшим обчисленням інтегрального показника коагуляції.

Недоліком відомого способу є те, що він заснований тільки на визначенні показників, що динамічно змінюються, не враховує генетичної схильності до змін в системі гемостазу, не дозволяє оцінити індивідуальну схильність до розвитку акушерських ускладнень.

Найбільш близьким з технічної суті і результату, що досягається, є спосіб діагностики невиношування вагітності [патент РФ № 2330071, МПК C12Q 1/68, заявка № 2006145533/13 від 21.12.2006, опубл. 27.07.2008], який включає одночасне тестування ДНК на наявність поліморфізму аналіз поліморфізму генів R353Q гена фактора VII згортання крові та поліморфізм C677T гена MTHFR.

Під генетичними поліморфізмами в даний час розуміють наявність в популяції кількох різних варіантів гена (алелей), які здатні надавати неоднаковий вплив на якісні чи кількісні характеристики кодованого білкового продукту. В даний час генетичний поліморфізм розглядається як "псевдонормального" явище, тому що більшість генів людини є поліморфними і окремі алельні варіанти широко розповсюджені в популяції.

Однак недоліком відомого способу є те, що маркери, які визначаються, не повністю відображають причини невиношування та не характеризують найбільш значущі тромбофілічні зміни при вагітності.

Відомий спосіб також не враховує наявності поліморфізму в гені активатора плазміногену, фібриногену та параоксанази, патологічні алелі яких ускладнюють перебіг вагітності.

В основу способу поставлена задача удосконалення діагностики невиношування вагітності за рахунок комплексної оцінки генетичних факторів в системі гемостазу шляхом прогнозування ризику розвитку тромбозів, що приведе до підвищення точності діагностики та забезпечить зниження частоти невиношування вагітності знижені материнської і перинатальної захворюваності та смертності

Спосіб діагностики невиношування вагітності, що включає одночасне тестування ДНК на наявність поліморфізму гена фолатного обміну - метилентетрагідрофолатредуктази (MTHFR) - C677T, згідно з корисною моделлю, додатково визначають маркери генетичної тромбофілії, а саме: мутації 1691 G→A в гені фактора V Leiden, мутації 20210 G→A в гені протромбіну, поліморфізм 455 G→A в гені фібриногену B.

Спосіб діагностики невиношування вагітності у пацієнток з тромбофілією, заснований на комплексній оцінці генетичних поліморфізмів в системі гемостазу, дозволяє не тільки з високою точністю прогнозувати ризик розвитку тромбозів, але також планувати і контролювати лікувальні заходи, спрямовані на нормалізацію кровообігу в системі мати-плацента-плід. Враховуючи особливості фізіологічної адаптації системи гемостазу до вагітності, абсолютна більшість генетичних форм тромбофілії клінічно маніфестує саме протягом гестаційного процесу і, як виявилось, не тільки у формі тромбозів, але й у формі типових акушерських ускладнень.

Мутація 1691 G→A в гені фактора V Leiden - є найбільш значущим генетичним дефектом гемостазу та являється частою причиною високого ризику тромбозу і, як наслідок, несприятливий результатом вагітності;

Мутація 20210 G→A в гені протромбіну, так як ген протромбін кодує білок-протромбін, який є одним з головних факторів системи згортання крові, варіант мутації гена призводить до підвищеної експресії гена та підвищує ризик тромбозів;

Поліморфізм 455 G→A в гені фібриногену B, внаслідок патологічної мутації порушується механізм зв'язування молекули фібриногену з тромбіном, що забезпечує високу концентрацію останнього та продовження процесу коагуляції і як наслідок високу частоту тромбозів.

Враховуючи, що ДНК-діагностика тромбофілій є єдиним способом профілактики більшості акушерських ускладнень, які пов'язані з цією патологією, економічна та соціальна ефективність цієї технології виявляється рекордно високою, забезпечуючи залучення значних коштів в розвинутих країнах.

- 5 Спосіб діагностики невиношування вагітності виконується наступним чином. Дослідження генетичних поліморфізмів проводили за допомогою алель-специфічної полімеразної ланцюгової реакції, з наступною детекцією методом електрофорезу в 3 % агарозному гелі. Використовувався комплект реагентів "SNP-експрес" виробництва НПФ "Літех" (Росія) для визначення поліморфізмів в геномі людини. З примірником виділеної ДНК паралельно
- 10 проводять дві реакції ампліфікації - з двома парами алель-специфічних праймерів. Дослідним матеріалом являється цільна венозна кров, 2000 мкл якої забирали в вакуумну пробірку з ЕДТА. Методика проведення включає три етапи. Перший - виділення ДНК з лейкоцитів цільної крові за допомогою реагента "ДНК-експрес-кровь" ("Літех" Росія). Виділенні на першому етапі ДНК зберігали в пробірках "Еппендорф" при температурі -200С не більше 6 місяців до проведення
- 15 наступного етапу. Другий етап - проведення ПЛР з використанням комплекту реагентів для ампліфікації "SNP-експрес". Третій - детекція продуктів ампліфікації методом горизонтального електрофорезу в 3 % агарозному гелі. Продукти ПЛР становляться видимими в 3 % агарозному гелі після прокрашування бромистим етидієм за допомогою їх флюоресценції в ультрафіолетовому світлі. На основі отриманих даних виявляють розподіл частот генотипів
- 20 мутації 1691 G→A в гені фактора V Leiden, мутації 20210 G→A в гені протромбіну, поліморфізм 455 G→A в гені фібриногену B та поліморфізм гена фолатного обміну - метилентетрагідрофолатредуктази (MTHFR) - 677C→T.

Результати аналізу дозволяють надати три виду висновків: нормальна гомозигота, гетерозигота, мутантна гомозигота. Методи ДНК-діагностики не є дешевими, але їх ціна, як

25 правило, не вище решти високотехнологічних лабораторних досліджень.

Для реалізації запропонованого способу діагностики невиношування вагітності було обстежено 104 вагітних в першому, другому та третьому триместрах вагітності. Дослідну групу склали 59 вагітних з невиношуванням вагітності. 53 жінки мали в анамнезі втраті вагітності в першому триместрі, 6 - в другому та третьому триместрах. Контрольну групу склали 45

30 соматично здорових жінок з фізіологічним перебігом вагітності та необтяжливим акушерським анамнезом.

Розподіл частот мутацій в дослідній групі наведені в таблиці. Проведено аналіз генних поліморфізмів у вагітних з невиношуванням. Встановлено, що зустрічальність мутацій у жінок з невиношуванням вагітності була вищою в порівнянні з групою контролю (42,4 % при 20 %;

35 $p < 0,05$).

Таблиця

Розподіл частот мутацій

	Групи дослідження	Генотип, %			Алелі, %	
		G/G	G/A	A/A	G	A
1	FV Лейдена G1691A					
	Вагітні з невиношуванням (n=59)	77,97	15,25	6,78	85,59	14,41*
	Контроль (n=45)	95,56	4,44	0,00	97,78	2,22
2	Протромбін G20210A					
	Вагітні з невиношуванням (n=59)	91,53	6,78	1,69	94,92	5,08
	Контроль (n=45)	97,78	2,22	0,00	98,89	1,11
3	Фібриноген p G455A					
	Вагітні з невиношуванням (n=59)	59,32	28,81	11,86	73,73	26,27*
	Контроль (n=45)	77,78	20,0	2,22	87,78	12,22
4	MTHFR-C677T					
	Вагітні з невиношуванням (n=59)	22,75	35,81	41,44	43,75	56,25
	Контроль (n=45)	67,82	23,54	8,64	75,45	24,55
* - достовірна відміна з показниками контрольної групи ($p < 0,05$).						

Аналіз плинності вагітності в дослідній групі показав, що загроза зриву мала місце в 89 % випадків ($p < 0,05$). У 16 % вагітність закінчилась в терміні до 12 тижнів, у 4,3 % трапився пізній

40 мимовільний викидень, у 19,4 % вагітність закінчилась передчасними пологами, з них 40 % - передчасне відшарування нормально розташованої плаценти, у 20 % - прееклампсія

середнього ступеня тяжкості, в 40 % передчасний розрив плодових оболонок. В контрольній групі вагітність закінчилась терміновими родами, загрозу переривання вагітності мали місце в 22 %, в одному випадку була діагностовано затримка розвитку плоду, в 44 % була відмічена гестаційна анемія, у 19,5 % - гестаційні набряки.

- 5 Приклад 1. Вагітна Б., 31 рік, взята на облік в терміні 9-10 тиж. Вагітність 3-а, пологи - 1-ї. Акушерський анамнез: 2003, 2006 роки - мимовільні викидні в терміні 9-11 тиж. Спадковість: у мами - 4 мимовільних викидні, пологи - 1, у дідуса по материнській лінії - ІЗСД. Після обстеження в загально-клінічних аналізах, консультація генетика та біохімічний скринінг, гормональне обстеження та визначення маркерів набутої тромбофілії - патології не виявлено.
- 10 Обстеження на маркери генетичної тромбофілії показало наявність патологічної гомозиготи гена Лейдена-Arg506→Gln та фібриногену - 455G→A. Діагностика гена протромбіну, MTHFR, інгібітори активатора плазміногену, параоксанази виявила нормальну гомозиготу. Було призначено протитромботичну терапію НМГ та антиагрегантами на весь період вагітності. Вагітність закінчилась пологамі в терміні 38 тиж, хлопчиком, 3,0 кг, 52 см, по шкалі Апгар 8-9
- 15 бал. Терапію НМГ було продовжено весь післяпологовий період.

- Приклад 2. Вагітна С, 29 років, взята на облік в терміні 11-12 тиж. Вагітність 3-а, пологи -1-ї. Акушерсько-гінекологічний анамнез: 2007, 2008 роки - мимовільні викидні в 8-10 тиж.; вторинне безпліддя з 2009 року (два роки). Знаходиться на обліку у гастроентеролога, ендокринолога. Спадковість: у матері-ІХС, гіпертонічна хвороба - ІІ ст, цукровий діабет ІІ типу. Після обстеження
- 20 в загальноклінічних аналізах, консультація генетика, гормональне обстеження, дослідження на маркери набутої тромбофілії - патології не знайдено. Обстеження на маркери генетичної тромбофілії показало наявність патологічної гомозиготи гена фібриногену - 455G→A та гена інгібітора активатора плазміногену. Діагностика гена протромбіну, Лейдена, MTHFR, параоксанази виявила нормальну гомозиготу. Вагітність протікала з періодами загрози
- 25 переривання, токсикозом першої половини вагітності та гестаційною анемією легкого ступеня. Було призначено протитромботичну терапію НМГ та антиагрегантами на весь період вагітності. Вагітність закінчилась пологамі в терміні 39 тиж., хлопчиком, 3,2 кг, 53 см, по шкалі Апгар 8-9 бал. Терапію НМГ було продовжено весь післяпологовий період.

- 30 Таким чином, запропонований спосіб діагностики невиношування вагітності сприяє зниженню частоти невиношування вагітності у вагітних з генетичними формами тромбофілії, що дозволить знизити кількість акушерських і перинатальних ускладнень.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 35 Спосіб діагностики невиношування вагітності, що включає одночасне тестування ДНК на наявність поліморфізму гена фолатного обміну - метилентетрагідрофолатредуктази (MTHFR) - C677T, який **відрізняється** тим, що додатково визначають маркери генетичної тромбофілії, а саме: мутації 1691 G→A в гені фактора V Leiden, мутації 20210 G→A в гені протромбіну, поліморфізм 455 G→A в гені фібриногену В.

40

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

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