



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **101161** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
A61B 10/00
G01N 33/49 (2006.01)
A61B 5/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2015 02740	(72) Винахідник(и): Венцківська Ірина Борисівна (UA), Прощенко Ольга Миколаївна (UA), Загородня Олександра Сергіївна (UA)
(22) Дата подання заявки: 26.03.2015	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.08.2015	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, бул. Шевченка, 13, м. Київ-4, 01601 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.08.2015, Бюл.№ 16	

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ НЕВИНОШУВАННЯ ВАГІТНОСТІ

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування невиношування вагітності включає дослідження навколоплідних. Методом алель-специфічної полімеразної ланцюгової реакції проводять дослідження генетичного поліморфізму, із зразків периферійної крові виділяють геномну ДНК, виявляють генетичні предиктори тромбофілії, порівнюють з контролем і при зміні показників прогнозують невиношування вагітності.

UA 101161 U

Корисна модель належить до медицини, а саме акушерства і гінекології, і може знайти широке застосування у визначенні ризику невиношування вагітності.

В даний час питання невиношування вагітності (НВ) має статус одного з найбільш пріоритетних напрямків акушерства у зв'язку зі стабільно високою частотою у світовій популяції і значною поширеністю несприятливих наслідків вагітності для матері та новонародженого. Частота невиношування вагітності коливається від 10 до 25 %, а в I триместрі вона може досягати 50 %. Незважаючи на тривале і всебічне вивчення проблеми невиношування вагітності, етіологічні фактори, патогенетичні механізми самовільного викидня досі повністю не з'ясовані. У клінічній практиці до 20 % повторних викиднів після виключення всіх можливих причин залишаються невідомими. Епідеміологічні дослідження останніх десятиліть показують, що спадкові та набуті тромбофілії матері приводять до розвитку патогенетичних механізмів цього стану [1, 2]. Невиношування вагітності розглядають при цьому як мультифакторіальне захворювання - результат адитивної дії багатьох генів і зовнішніх факторів [3]. У більшості випадків, коли репродуктивні втрати на ранніх термінах вагітності мають рекурентний характер, представляється можливим припустити наявність постійних факторів - генетично детермінованих. Беручи до уваги особливості фізіологічної адаптації системи гемостазу до вагітності, більшість генетичних і набутих форм тромбофілії маніфестують саме під час гестаційного процесу. Тромбофілія - це підвищена схильність організму до розвитку тромбозів, яка обумовлена порушеннями регуляторних механізмів різних компонентів системи гемостазу; різних дефектів (точкових мутацій) одного і того ж компонента, які варіюють за ступенем вираженості залежно від гетеро- або гомозиготної форми мутації; поєднуються з іншими генетичними або набутими дефектами та/або факторами ризику [7].

За сучасними даними, частка спадкових тромбофілій в структурі причин невиношування вагітності становить 30-55 %. Серед яких основними вважають поліморфізм генів ферментів фолатного циклу (5,10-метилентетрагідрофолатредуктаза MTHFR C677T; згортання крові (мутація генів протромбіну FII G20210A, фактора V FV (Leiden) G1691 A); системи фібринолізу (поліморфізм гена інгібітора активатора плазміногена 1 PAI-1675 5G/4G) [4, 7].

MTHFR - це фермент, групи флавопротеїнів, який відновлює 5,10-метилентетрагідрофолат до 5-метилтетрагідрофолату. Останній є донором метильних груп і основним джерелом тетрагідрофолату, похідні якого, в свою чергу, є специфічними коферментами в синтезі метіоніну з гомоцистеїну. Носійство алеля 677T призводить до термолабільності ферменту, що надалі призводить до заміни в молекулі ферменту амінокислоти аланіну на валін в каталітичному домені (Ala222Val). В результаті чого відбувається зниження активності ферменту *in vitro* на 60 % у гомозигот по поліморфному алелю, і на 30 % в гетерозигот, що тягне за собою підвищення рівня гомоцистеїну. Патогенетичні механізми розвитку ускладнень при гіпергомоцистеїнемії наступні: пошкодження ендотеліальної вистилки судин із запуском процесів коагуляції, мікротромбоутворенню, що приводить до порушення інвазії трофобласта, плаценталії і фетоплацентарного кровообігу. Зараз гіпергомоцистеїнемія розглядається як одна з причин розвитку АФС. Гомоцистеїн вільно переходить через плаценту і може викликати тератогенну і фетотоксичну дію, призводить до зміни метилування центромерних районів хромосом, порушення розходження хромосом в оогенезі і підвищує ризик хромосомних аберацій, призводить до підвищеного включенню dUMP замість dTMP в ланцюзі ДНК клітин плоду, що тягне за собою вирізання нуклеотидних пар, розриви ланцюгів ДНК і запуск механізмів апоптозу [5].

Основним ендегенним механізмом, що запобігає тромбоутворенню, є фібриноліз. Центральним компонентом фібринолітичної системи є інгібітор активатора плазміногена 1 (PAI-1), який утворюється в ендотеліальних клітинах, гепатоцитах. Припускають, що активатор плазміногена тканинного типу 1 вивільняються неуразженим ендотелієм, але при цьому інактивується активованим білком С. Рівень PAI-1 в плазмі залежить від поліморфізму делеція/вставка гуанозину (5G/4G) в області промотера гена PAI-1 49. Пригнічення фібринолізу, викликане поліморфізмом гену PAI-1 (у більшості випадків гомозиготними формами), як відомо, порушує імплантацію бластоцисти в ендометрії і формування системи мати-плацента-плід, що, з одного боку, є причиною безпліддя і ранніх преємбріонічних і ембріонічних втрат, а з іншого, призводить до плацентарних аномалій і є патогенетичним механізмом акушерських ускладнень - мимовільних викиднів (ранніх і пізніх), антенатальної загибелі плода [6].

Однією з мутацій, асоційованих із тромбофіліями, що найбільш часто зустрічається в європейській популяції (4-6 %), є мутація FV Leiden. Внаслідок мутації G1691A відбувається заміна залишку аргініну на гліцин в ділянці 506, що призводить до розвитку нечутливості фактора V до активованого білка С і супроводжується підвищенням рівня цього фактора в плазмі і, відповідно, посиленням утворення тромбіну. Більш того, мутантний фактор V зменшує

кофакторну активність в системі нейтралізації VIII фактора активованим білком С. Обидві ці аномалії призводять до феномену резистентності Va фактора до активованого білка С і патології згортання крові. При цьому не відбувається подовження часу згортання після додавання до плазми активованого білка С. Наявність цієї мутації підвищує ймовірність розвитку цілого ряду ускладнень вагітності: невиношування вагітності (ризик підвищується в 3 рази), відставання розвитку плода, гестоз, фетоплацентарна недостатність [4, 7, 8].

Протромбін (коагуляційний фактор II або F2) синтезується в печінці за участю вітаміну К і є одним з ключових компонентів системи згортання крові. У ході ферментативного розщеплення протромбіну утворюється тромбін. Мутація гена протромбіну G20210A характеризується заміною нуклеотиду гуаніну нуклеотидом аденіну в позиції 20210. При поліморфізмі гена рівень протромбіну в плазмі крові може бути підвищений на 30 % за рахунок більш стабільної мутантної матричної РНК, що провокує появу надмірної кількості фібринових згустків і підвищує ризик розвитку венозних тромбозів, призводить до втрат плода переважно в I триместрі. Підвищене утворення тромбіну, викликане цією мутацією веде до високого споживання білка С і виступає однією з причин резистентності до активованого білка С. Мутація успадковується за аутосомно-домінантним типом. Це означає, що тромбофілія може виникати навіть у гетерозиготного носія зміненого гена (G/A). За даними літератури, гетерозиготное носійство мутації F2 G20210A асоціюється з порушеннями плацентації і зростанням ризику невиношування вагітності до 12 разів і, за даними ряду авторів, є фактором ризику викиднів саме на ранніх термінах вагітності [8].

Таким чином, відкриття низки досить поширених генетично обумовлених форм тромбофілії сприяло появі нових поглядів на причини та патогенез репродуктивних втрат. В даний час вивчення генетичних предикторів на процеси імплантації, інвазії трофобласта, подальше функціонування плаценти і перебіг вагітності набувають особливої актуальності і потребують подальшого дослідження.

Найближчим аналогом є спосіб визначення ризику невиношування вагітності, що включає вивчення навколоплідних вод роділь (7). Проте цей спосіб має суттєві недоліки, а саме тривалість виконання, низька інформативність.

В основу корисної моделі поставлена задача, що полягає у визначенні ролі тромбофілії у невиношуванні вагітності.

Технічним результатом є підвищення точності прогнозування ризику невиношування вагітності.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі, який передбачає дослідження навколоплідних вод, згідно з корисною моделлю, методом агель-специфічної полімеразної ланцюгової реакції проводять дослідження генетичного поліморфізму, із зразків периферійної крові виділяють геномну ДНК, виявляють генетичні предиктори тромбофілії, порівнюють з контролем і при зміні показників прогнозують невиношування вагітності.

Робота виконана на кафедрі акушерства та гінекології № 1 Національного медичного університету імені О.О. Богомольця на базі гінекологічного відділення перинатального центру м. Києва. Нами було обстежено 280 жінок, з них 256 з невиношуваною вагітністю, з числа яких у 84 пацієнток з самовільним викиднем (32,8 %) було виявлено наявність спадкової мутації: вони склали основну групу обстежених жінок. Контрольну групу склали 37 вагітних жінок з фізіологічним перебігом вагітності. Всі жінки проходили молекулярно-генетичне тестування мутації генів MTHFR C677T, FV (Leiden) G1691A, FII G20210A і PAI-1675 5G/4G. Дослідження генетичного поліморфізму проводилося з використанням методу агель-специфічної полімеразної ланцюгової реакції, з подальшим гідролізом ампліконів відповідною рестрикуючою ендонуклеазою. В молекулярно-генетичній лабораторії із зразків периферійної крові проводили виділення геномної ДНК за допомогою комерційного набору "ДНК-сорб-В". Полімеразну ланцюгову реакцію проводили за модифікованими протоколами з олігонуклеотидними праймерами. Стан ампліфікаційних фрагментів аналізували за допомогою електрофорезу в 1,5 % агарозному гелі. Амплікони підлягали гідролітичному розщепленню ендонуклеазами рестрикції, отримані фрагменти аналізували методом поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ). Залежно від наявності або відсутності відповідних сайтів рестрикції у ампліфікованій ділянці ДНК, продукти рестрикції мали різну молекулярну вагу, відповідно до якої визначали генотип.

Аналіз розподілу генотипів досліджуваних SNP проводився за допомогою тесту хі-квадрат, а також точного критерію Фішера. З метою ранжування предикторів за значимістю їх впливу і можливої асоціації з ризиком розвитку захворювання використовувалися два непараметричних методи, а саме: метод випадкового лісу (RandomForest) [9] і метод багатовимірної зменшення розмірності (Multifactorial Dimensionality Reduction) [10] для визначення міжгенної

взаємодії (епістазу). У параметрах побудови для методу випадкового лісу було вказано 1000 дерев, з можливістю вибору 2 випадкових предикторів для створення кожного з вузлів класифікації. Метод багатофакторного зменшення розмірності був застосований з стандартними налаштуваннями і установкою значення крос-перевірочного параметра, рівного

10. Для фільтрації найбільш важливих факторів ризику використовувався метод, запропонований С. Strobl [9]. Статистично значущими результатами вважалися ті, які досягли рівня статистичної значущості $p < 0,05$. Аналіз даних був проведений в середовищі для статистичних розрахунків R (ver. 3,0), а також з використанням Statistical Package for Social Science program (SPSS for Windows, version 21.0, SPSSInc, Chicago, IL.).

Отримані результати проведеного молекулярно-генетичного тестування показали, що мутація MTHFR C677T виявлена в 32 жінок (38,1 %), поліморфізм гена PAI-1675 5G/4G в 16 (19,0 %), FV (Leiden) G1681A в 7 (8,3 %), FII G20210A в 1 (1,2 %) і комбінації мутацій у 28 (33,3 %). Для виявлення можливих асоціацій поліморфізмів генів з невиношеною вагітністю нами був проведений порівняльний аналіз частот алелей і генотипів між пацієнтками з невиношуванням вагітності та контрольною групою, який показав наступні статистично значущі відмінності (табл.).

Згідно з отриманими даними частоти різноманітності генотипу мутації гена MTHFR C677T встановлено, що у жінок основної групи гетерозиготний генотип (51,2 %) зустрічався частіше в порівнянні з контрольною групою (13,5 %), а частка гомозиготних носіїв мутації гена MTHFR C677T (15,4 %) була в три рази більше показника контрольної групи (5,4 %). Аналіз мутації гена PAI-1 675 5G/4G в групі жінок з невиношеною вагітністю показав зниження частки нормального генотипу 5G/5G (54,8 %) у порівнянні з контрольною групою (75,7 %, $p < 0,05$). У той же час частка гетеро- і гомозиготних носіїв генотипів була вище в порівнянні з контрольною групою (25,0 % і 20,2 %, проти 18,9 % і 5,4 %). У групі жінок з невиношеною вагітністю виявлено високу частоту гетеро- і гомозиготної мутації FV (Leiden) G1691A порівняно з даними контрольної групи.

Таблиця

Частота різноманітності поліморфізму генів MTHFR C677T, FV (Leiden) G1691 A, FII G20210A і PAI-1675 5G/4G

	Контрольна група n=37		Основна група n=84	
	абс. ч.	%	абс. ч.	%
MTHFR C677T C/C	30	81,1 %	28	33,3 %*
MTHFR C677T C/T	5	13,5 %	43	51,2 %*
MTHFR C677T T/T	2	5,4 %	13	15,4 %*
PAI-1-675 5G/4G 5G/5G	28	75,7 %	46	54,8 %*
PAI-1-675 5G/4G 5G/4G	7	18,9 %	21	25,0 %*
PAI-1-675 5G/4G 4G/4G	2	5,4 %	17	20,2 %*
FV G1691A G/G	36	97,3 %	68	81,0 %*
FV G1691A G/A	1	2,7 %	16	19,0 %*
FV G1691A A/A	-	-	-	-
FII G20210A G/G	36	97,3 %	77	91,7 %*
FII G20210A G/A	1	2,7 %	7	8,3 %*
FII G20210A A/A	-	-	-	-

* Достовірні відмінності порівняно з контролем $p \leq 0,05$

За допомогою методу випадкового лісу вдалося виявити два статистично значущих предиктори, які асоціюються з ризиком розвитку захворювання - MTHFR C677T і FV G1691 A, причому поліморфізм MTHFR C677T надає найбільше значення серед усіх вивчених поліморфізмів.

Метод багатофакторного зменшення розмірності був застосований з метою визначення типу зв'язку між поліморфізмом, а також аналізу комбінацій генотипів, які асоціюються з ризиком розвитку невиношування вагітності. За допомогою методу багатофакторного зменшення розмірності була отримана модель, яка також містила 2 поліморфізму, а саме: MTHFR C677T і FV G1691 A. Прогностична цінність такої моделі склала 73 % на тестуючій вибірці з крос-перевірочним значенням рівним 9/10. Нам вдалося встановити, що між поліморфізмом MTHFR C677T і FV G1691A відсутня синергічна взаємодія.

Таким чином, комбінації як гомо-, так і гетерозиготних генотипів генів MTHFR C677T, FV (Leiden) G1691A асоціюються з ризиком розвитку репродуктивних втрат. Розрахований коефіцієнт співвідношення шансів показав найбільше підвищення ризику повторних викиднів (у 13 разів) при поліморфізмі MTHFR C677T T/T і FV (Leiden) G1691A G/A.

Застосувавши комбінацію методів випадкового лісу і багатофакторного зменшення розмірності, нам вдалося визначити найбільш важливі предиктори, які асоціюються з ризиком розвитку невиношеної вагітності. Була створена модель з класифікаційної цінністю 73 %, яка складається з 2 найбільш впливових і статистично значущих предикторів - поліморфізмів MTHFR C677T і FV G1691A. Було визначено, що поліморфізми MTHFR C677T і FV G1691A представляють головні незалежні ефекти, а також виявлені комбінації генотипів, які асоціюються з ризиком розвитку невиношування вагітності. Тому молекулярно-генетичне обстеження на спадкову тромбофілію ми вважаємо обов'язковим в алгоритмі обстеження жінок з невиношуванням вагітності. Своєчасне виявлення генетичних предикторів тромбофілії у жінок з невиношеною вагітністю дозволить оптимізувати прекоцепційну підготовку до наступної вагітності для зниження ризику репродуктивних втрат та акушерських ускладнень і служить показанням до посиленого клініко-лабораторного контролю гемостазу під час вагітності та при необхідності проведення лікувальних заходів.

Джерела інформації:

1. Айламазян Э.К., Зайнулина М.С. (2010) Наследственная тромбофилия: дифференцированный подход к оценке риска акушерских осложнений. Акушерство и гинекология. N 3. - р. 3-9.
2. Onderoglu L., Baykal C., Al A. [et al.] (2006) High frequency of thrombophilic disorders in women with recurrent fetal miscarriage Clin. Exp. Obstet. Gynecol. vol. 33, N1. - P. 50-54.
3. Беспалова О.Н. (2007) Генетика невынашивания беременности Журн акушерства и жен. болезней. N 1. - р. 81-95.
4. Bura-Rivière A. (2012) Thrombophilia and pregnancy. Rev. Prat. Vol. 62, N 7. - P. 937-942.
5. Murphy M.M., Fernandez-Ballart J.D. (2011) Homocysteine in pregnancy. Adv. Clin. Chem. Vol. 53. - P. 105-137.
6. Охтырская Т.А., Яворовская К.А., Шуршалина А.В. [и др.] (2011) Роль PAI-1 в повторных неудачах ВРТ Проблемы репродукции N 4. - P. 45-49.
7. Макацария А.Д. Бицадзе В.О., Акиншина С.В. (2007) Тромбозы и тромбоэмболии в акушерско-гинекологической клинике. Молекулярно-генетические механизмы и стратегия профилактики тромбоэмболических осложнений руководство для врачей- М.: МИА, P. 1059 с.
8. Herskovits A.Z., Morgan E.A., Lemire S.J. [et al.] (2013) An improved algorithm for activated protein C resistance and factor V Leiden screening Am. J. Clin. Pathol. Vol. 140, N3. - P. 379-386.
9. Strobl C., Boulesteix L., Kneib T (2008,) Conditional variable importance for random forests. BMC Bioinformatics. 9:307.
10. Alison A, Ritchie M, Marylyn D. (2006) Multifactor dimensionality reduction: An analysis strategy for modelling and detecting gene-gene interactions in human genetics and pharmacogenomics studies. Human genomics. 2:318-28.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозування невиношування вагітності, що включає дослідження навколоплідних вод, який **відрізняється** тим, що методом агель-специфічної полімеразної ланцюгової реакції проводять дослідження генетичного поліморфізму, із зразків периферійної крові виділяють геномну ДНК, виявляють генетичні предиктори тромбофілії, порівнюють з контролем і при зміні показників прогнозують невиношування вагітності.

Комп'ютерна верстка М. Мацело

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

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