



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **103878** (13) **U**  
(51) МПК (2015.01)  
**A61B 10/00**  
**G01N 33/48** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

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

(21) Номер заявки:	<b>u 2015 04153</b>	(72) Винахідник(и): <b>Венцківська Ірина Борисівна (UA), Прощенко Ольга Миколаївна (UA), Загородня Олександра Сергіївна (UA)</b>
(22) Дата подання заявки:	<b>29.04.2015</b>	(73) Власник(и): <b>НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, бул. Шевченка, 13, м. Київ-4, 01601 (UA)</b>
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	<b>12.01.2016</b>	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>12.01.2016, Бюл.№ 1</b>	

**(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ РИЗИКУ НЕВИНОШУВАННЯ ВАГІТНОСТІ**

**(57) Реферат:**

Спосіб прогнозування ризику невиношування вагітності включає проведення клінічних та лабораторних досліджень. Додатково проводять молекулярно-генетичне тестування мутації гена інгібітора активатора плазміногену 1 675 5G/4G в лейкоцитах периферійної крові. Методом полімеразної ланцюгової реакції проводять ампліфікацію послідовностей ДНК in vitro. Виявляють поліморфізм гена та порівнюють з контролем і прогнозують ризик невиношування вагітності.

**UA 103878 U**



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

Серед проблем сучасного акушерства невиношування вагітності (НВ) займає одне з провідних місць. Майже 10-15 % вагітностей уриваються спонтанно [6]. Максимальне число самовільних абортів (81,1 %) спостерігається у I триместрі, причому 38 % з них в перші 7-8 тижнів. В останні роки з'явилася значна кількість публікацій, присвячених наявності асоціації між розвитком невиношування вагітності і тромбофілією, як спадковою, так і набутою. За даними ряду авторів, питома вага тромбофілії у структурі причин синдрому втрати плода складає 40-75 % [1, 10].

Тромбофілія - це підвищена схильність організму до розвитку тромбозів, яка обумовлена порушеннями регуляторних механізмів системи гемостазу або зміною властивостей окремих її ланок. Поняття "тромбофілії" у 1965 р. ввів Egeberg O., який вперше описав спадковий дефіцит антикоагулянтного білка антитромбіну. Згодом було відкрито інші мутації в генах, що кодують фактори системи гемостазу і фібринолізу, та був виявлений зв'язок цих мутацій з високим ризиком розвитку тромбозів. Таким чином, до відомих чинників ризику тромбозів (уповільнення току крові, порушення цілісності судинної стінки та посилення процесів згортання крові) було включено спадкову причину цього важкого ускладнення. Природжені дефекти гемостазу формуються при викривленні генетичної інформації, що міститься у відповідних генах, під впливом мутацій. Відомо більше 40 генів, мутаційні зміни яких асоціюються з тромбофіліями [2, 7].

Активатори плазміногену тканинного і урокіназного типу відіграють важливу роль у формуванні плазміну, і знаходяться в крові в комплексі зі специфічними і неспецифічними інгібіторами, серед яких найбільше значення має інгібітор активатора плазміногену 1 (PAI 1). Інгібітор активатора плазміногену є центральним компонентом фібринолітичної системи, утворюється в ендотеліальних клітинах, гепатоцитах. У неактивній формі може виділятися з тромбоцитів. Поліморфізм PAI-1 675 5G/4G виявлений в промоторній (регуляторній) ділянці. Алель 5G супроводжується меншою активністю, ніж алель 4G. Тому у носіїв алеля 4G концентрація PAI-1 вища, ніж у носіїв алеля 5G, що під час вагітності призводить до зниження активності тромболітичної системи [9].

Встановлено, що в процесі підготовки до імплантації під впливом прогестерону в ендометрії відбувається підвищення PAI-1 та зниження рівня активаторів плазміногену тканинного і урокіназного типів, металопротеаз матриксу та вазоконстриктора - ендотеліну 1 [3]. Ця фізіологічна регуляція гемостазу, фібринолізу, екстрацелюлярного матриксу та судинного тонуспрямовані на попередження утворення геморагій при подальшій інвазії трофобласта. З боку бластоцисти під контролем хоріонічного гонадотропіну синтезуються активатори плазміногену тканинного і урокіназного типів, які необхідні для руйнування екстрацелюлярного матриксу в процесі імплантації. Клітини ендометрію не фагоцитуються та не руйнуються, а "розсовуються" за допомогою контактного інгібування. На місце, що утворилося, мігрує ембріон (аваскулярна або гістіотрофна фаза). Саме в цю фазу віруси, токсини, антитіла можуть впливати на повноцінність імплантації більше, ніж в інші періоди [4, 8].

Пригнічення фібринолізу, викликане поліморфізмом гена PAI-1, у більшості випадків гомозиготні форми, порушує імплантацію бластоцисти до ендометрію і формування системи мати-плацента-плід, що з одного боку є причиною безпліддя і ранніх преембріонічних і ембріонічних втрат, а з іншого - призводить до плацентарних аномалій і складає патогенетичний механізм акушерських ускладнень - самовільних викиднів (ранніх і пізніх), антенатальної загибелі плода. Поряд з регуляцією фібринолізу PAI-1 бере участь у протеолітичному каскаді, залученні у фізіологічні та патологічні процеси інвазії та ремоделювання тканин [5]. При поліморфізмі генів PAI-1 звичне переривання часто відбувається на ранніх термінах вагітності і нерідко супроводжується утворенням ретрохоріальної гематоми.

Таким чином результати чисельних досліджень підтверджують актуальність вивчення впливу поліморфізму гена інгібітора активатора плазміногену 1 675 5G/4G.

Найбільш близьким та вибраним як прототип є спосіб прогнозування ризику невиношування вагітності, що включає проведення клінічних та лабораторних досліджень (8). Проте цей спосіб має суттєві недоліки, а саме тривалість, низька інформативність.

Задача корисної моделі - прогнозування репродуктивних втрат шляхом вивчення впливу поліморфізму гена інгібітора активатора плазміногену 1 675 5G/4G.

Технічний результат - підвищення точності прогнозування ризику невиношування вагітності.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі, який включає проведення клінічних та лабораторних досліджень, згідно з корисною моделлю, додатково проводять молекулярно-генетичне тестування мутації гена інгібітора активатора плазміногену 1 675 5G/4G

в лейкоцитах периферійної крові, потім методом полімеразної ланцюгової реакції проводять ампліфікацію послідовностей ДНК *in vitro*, виявляють поліморфізм гена, порівнюють з контролем і прогнозують ризик невиношування вагітності.

Робота виконана на кафедрі акушерства і гінекології № 1 НМУ імені О.О. Богомольця на базі гінекологічного відділення Перинатального центру м. Києва. Було обстежено 256 жінок з невиношуванням вагітності, з числа яких відібрано 84 (32,8 %) із виключенням інфекційних, анатомофункціональних і нейроендокринних причин невиношування вагітності. Вони склали основну групу обстежених жінок. В залежності від форм невиношування вагітності пацієнтки основної групи були розділені на: I група - 39 пацієнток із 1 викиднем, II група - 45 пацієнток з 2 і більше викиднями в анамнезі. Контрольну групу склали 37 вагітних жінок з фізіологічним перебігом вагітності. Всі жінки проходили комплексне обстеження, що включало: клінічні методи дослідження, лабораторні: визначення гормонального статусу, інфекційний скринінг, молекулярно-генетичне тестування мутації гена інгібітора активатора плазміногену 1 675 5G/4G. Для проведення молекулярно-генетичного тестування геному ДНК із лейкоцитів периферійної крові виділяли за стандартною методикою. На подальших етапах дослідження проводили ампліфікацію послідовностей ДНК *in vitro*, використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Ідентифікацію алельних варіантів проводили по наявності сайту впізнавання для відповідної рестрикуючої ендонуклеази за допомогою електрофорезу в агарозному гелі.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням статистичних пакетів IBM SPSSStatistics (ver. 21) та статистичного середовища R (ver. 3.1). При порівнянні частот генотипів використовували стандартний критерій  $\chi^2$  на рівні статистичної значущості  $p < 0,05$  та застосовували точний критерій Фішера. Величину ефекту визначали за величиною співвідношення шансів (OR, 95 % довірчий інтервал). Найкращу генетичну модель вибирали за інформаційним критерієм Айкяке. При найменшому значенні цього інформаційного критерію, генетична модель вважалася найкращою.

Отримані результати молекулярно-генетичного тестування поліморфізму гена PAI-1-675 5G/4G серед обстежених жінок із різним числом викиднів у порівнянні з контролем представлені в табл. 1. Проведений аналіз частоти мутації гена PAI-1 675 5G/4G у групі жінок з невиношуванням вагітності показав статистично значуще зниження частки нормального генотипу 5G/5G у жінок як з 1, так із 2 і більше викиднями в анамнезі (51,3 % і 57,8 % відповідно), порівняно з контрольною групою (75,7 %,  $p < 0,05$ ). Разом із цим частка гетерозиготних носіїв серед жінок I групи (28,2 %) була дещо вищою порівняно з II групою (22,2 %) і в 1,5 рази більшою за показник контрольної групи (18,9 %). Гомозиготний генотип (20,5 % і 20,0 % відповідно) зустрічався статистично значуще частіше порівняно з контрольною групою (5,4 %) та не відрізнявся в межах основної групи. Частка поліморфного алеля 4G з найбільш високою частотою діагностувався в групі I (34,6 %), що майже вдвоє більше порівняно з контрольною групою (14,9 %,  $p < 0,05$ ).

Таблиця 1

Частота різноманітності генотипу мутації гена PAI-1-675 5G/4G ізольованої і в поєднанні з іншими спадковими тромбофілічним мутаціями

PAI-1-675 5G/4G	Контрольна група n=37		I група n=39		II група n=45	
	абс. ч.	%	абс. ч.	%	абс. ч.	%
<b>Генотипи</b>						
5G\5G	28	75,7 %	20	51,3 %*	26	57,8 %*
5G\4G	7	18,9 %	11	28,2 %*	10	22,2 %
4G\4G	2	5,4 %	8	20,5 %*	9	20,0 %*
<b>Алелі</b>						
5G	63	85,1 %	51	65,4 %*	62	68,9 %*
4G	11	14,9 %	27	34,6 %*	28	31,1 %*

\* Достовірні відмінності в порівнянні з контролем  $p \leq 0.05$

Аналізуючи сімейний тромботичний анамнез, встановлено, що серед жінок з гетерозиготною мутацією гена PAI-1 675 5G/4G (9 пацієнток) тромботичний анамнез у найближчих родичів був обтяжений у двох випадках (4,4 %) (II група) (тромбози вен нижніх кінцівок). При гомозиготному типі успадкування поліморфізму гена PAI-1-675 5G/4G у 2 жінок (1-2,6 % - I група; 1-2,2 % - II група) в анамнезі у близького родича були гіпертонічна хвороба та інфаркт міокарда.

При аналізі структури соматичних захворювань звертає на себе увагу те, що серед жінок із такою мутацією часто зустрічалось ожиріння. Так в I групі високий ІМТ був у 4 жінок (10,2 %) і у 5 II групи (11,1 %). У однієї жінки з генотипом 4G/4G відзначалися хронічна венозна недостатність, варикозне розширення вен нижніх кінцівок. В однієї жінки із ЗНВ і гомозиготним поліморфізмом гена PAI-1-675 5G/4G в анамнезі було 3 лапароскопічних втручання: два - з приводу позаматкової вагітності, третє - видалення ендометріюїдних кіст і роз'єднання злук у зв'язку трубно-перитонеальним фактором безпліддя. В подальшому вагітність наступила в результаті ДРТ.

При інфекційному скринінгу у трьох жінок (6,7 %) із ЗНВ і гетерозиготним і у 2 випадках (1-2,6 % - I група; 1-2,2 % - II група) з гомозиготним поліморфізмом гена PAI-1 675 5G/4G мало місце загострення герпес-вірусної інфекції. У двох вагітних II групи культуральним методом виявлена *Ureaplasma urealiticum*, проводилася антибактеріальна терапія. У однієї вагітної I групи з гомозиготним поліморфізмом гена PAI-1 675 5G/4G висіявся гемолітичний стафілокок в 10 ступені.

При аналізі гормонального фону встановлено, що у жінок з мутацією гена PAI-1 675 5G/4G як в I, так і в II групі мала місце тенденція до зниження показників концентрації прогестерону в плазмі крові та ця різниця не була достовірною. Оцінюючи рівень естрадіолу у жінок, встановлено, що показники статистично вірогідно не відрізнялись між собою і були у межах нормальних значень.

Поєднання гетерозиготного поліморфізму гена PAI-1 675 5G/4G з АФС мало місце в 2 випадках (4,4 %) (II група). У 3 жінок з генотипом 4G/4G був АФС.

У групі жінок з поліморфізмом гена PAI-1-6755G/4G 4G/4G (7 пацієнток) втрати в I триместрі вагітності мали 4 жінок (57,1 %), у 3 (42,9 %) - були втрати в II триместрі (в 15-16 тижнів кровотеча з наступним самовільним викиднем). Мимовільний викидень в терміні до 12 тиж. зафіксований у 5 жінок (3-I група, 2-II група) з гетерозиготним поліморфізмом гена PAI-1 675 5G/4G. У решти (4 особи) репродуктивні втрати мали місце у II триместрі.

Вагітність, що не розвивається мала місце у 1 жінки (14,2 %) із 1 аборт (генотип 5G/4G) і 2 (22,2 %) спостережених із ЗНВ (генотип 4G/4G і 5G/4G).

У I триместрі у 44,4 % пацієнток (2-I група, 2-II група) з гетерозиготним поліморфізмом гена PAI-1-675 5G/4G вагітність ускладнилася загрозою переривання з утворенням ретрохоріальних гематом в 5-6 тиж. вагітності (за даними УЗД), у двох жінок (22,2 %) при цьому було передлежання хоріона, в 2 (22,2 %) з них мала місце активація внутрішньосудинного згортання за даними підвищеного рівня ТАТ і Д-димер. У другому триместрі загроза переривання вагітності відзначалася у 2 (22,2 %) з 9 жінок, їм було потрібно стаціонарне лікування. У 1 пацієнтки з 17 тижнів було відмічено ЗРП. У 3 (33,3 %) вагітних за даними рівня молекулярних маркерів тромбофілії відзначалася активація внутрішньосудинного згортання.

У 2 жінок I групи і 3 II групи з гомозиготною мутацією гена PAI-1 675 5G/4G за даними УЗД в I триместрі діагностовано ретрохоріальні гематоми, у 3 із відшаруванням плідного яйця.

При гістологічному обстеженні виявлені зміни характеризувалися пікнозом ядер, коагуляційним некрозом цитоплазми і реактивною проліферацією клітин. Між ураженими клітинами розташовувалися тромби. У деяких випадках спостерігались незначні запальні зміни без ознак деструкції або інфільтрації. При цьому переважали реактивна проліферація судин і реканалізація тромбів, з дифузними відкладеннями гемосидерину і еозинофільними глобулами.

Характеризуючи групу жінок з поліморфізмом гена PAI-1-675 5G/4G, слід зазначити, що найчастіше зустрічалися ускладнення I триместра вагітності, які полягали в утворенні ретрохоріальних гематом у 4 з 7 в I групі (57,1 %) і 5 з 9 в II групі (55,6 %). Згідно з отриманими даними, ретрохоріальні/ретроамніотичні гематоми зустрічалися серед носіїв поліморфізму PAI-1 675 5G/4G (4G/4G і 5G/4G) як з одним, так і з 2 і більше викиднями майже у 2 рази частіше (57,1 % і 55,6 %), ніж групі контролю (9,7 %). Слід відзначити, що ретрохоріальні/ретроамніотичні гематоми переважно реєструвалися у жінок із гомозиготним генотипом.

Був проведений статистичний аналіз з метою виявлення можливої асоціації поліморфізму гена інгібітора активатора плазміногену 1 із ризиком розвитку невиношування вагітності. Використавши тест хі-квадрат із 2 ступенями свободи нам вдалося знайти статистично значущі відмінності у розподілі генотипів в групі жінок з невиношуванням вагітності та в контрольній групі ( $p < 0.05$ ). Визначена прогностична роль поліморфізму гена PAI-1 675 5G/4G в розвитку невиношування вагітності при аналізі частот алелів і генотипів між жінками з невиношуванням вагітності і контрольною групою. Співвідношення шансів можливих подальших репродуктивних втрат при мутації гена PAI-1 675 5G/4G склало 2,57 при 95 % довірчому інтервалі (ДІ) в межах 1,11-6,38.

Для виявлення асоціацій гомо- і гетерозиготного поліморфізму гена PAI-1 675 5G/4G проведено аналіз кодомінантної моделі розрахунку відношення шансів. Звертає на себе увагу той факт, що ризик невиношування вагітності у жінок із гомозиготним поліморфізмом майже втричі перевищував такий порівняно з жінками з генотипом 5G/4G. Отримані результати корелюють із клінічною характеристикою обстежених жінок.

Для виявлення можливої асоціації поліморфізму гена PAI-1 675 5G/4G із ризиком подальших репродуктивних втрат у жінок з різним числом викиднів проведено аналіз даних адитивних моделей.

Відношення шансів можливих подальших репродуктивних втрат при мутації гена PAI-1 675 5G/4G у жінок з I викиднем склало 2,31 при 95 % довірчому інтервалі (ДІ) в межах 1.18-4,97, а у жінок із ЗНВ - 1,98 (1,04-4,09) відповідно.

Отримані результати підтверджують роль поліморфізму гена PAI-1 675 5G/4G у ґенезі невиношування вагітності. Відношення шансів можливих подальших репродуктивних втрат при мутації гена PAI-1 675 5G/4G склало 2,57 при 95 % довірчому інтервалі (ДІ) в межах 1,11-6,38. Прогностично неблагоприємним є гомозиготний поліморфізм, ризик невиношування вагітності при якому майже втричі перевищував такий порівняно з жінками з генотипом 5G/4G. Отже обґрунтована доцільність тестування даного поліморфізму у жінок з невиношуванням вагітності при виключенні інфекційних, анатомофункціональних і нейроендокринних причин невиношування вагітності. Доцільним є молекулярно-генетичне тестування жінок навіть з одним викиднем в анамнезі.

Джерела інформації:

1. Кварацхелия Е.Е. Генетическая и приобретенная тромбофилии у пациенток с хронической гипертензией и метаболическим синдромом //Журн. Рос. о-ва акушеров-гинекологов. - 2006. - № 4. - С. 16-19.

2. Кох Н.В. Исследование влияния генетической предрасположенности к тромбофилии на течение беременности //Вестн. Новосиб. гос. ун-та. Сер. биология, клин. медицина. - 2008. - № 2. - С. 20-24.

3. Макацария А.Д. Метаболический синдром и тромбофилия в акушерстве и гинекологии. - М.: МИА, 2006. - 477 с.

4. Макацария А.Д. Тромбозы и тромбоэмболии в акушерско-гинекологической клинике. Молекулярно-генетические механизмы и стратегия профилактики тромбоэмболических осложнений: рук. для врачей - М.: МИА, 2007. - 1059 с.

5. Охтырская Т.А. Роль PAI-1 в повторных неудачах ВРТ //Проблемы репродукции. - 2011. - № 4. - С. 45-49.

6. Подзолкова Н.М. Невынашивание беременности: практическое руководство для врачей. - ГЭОТАР, 2012. - С. 25.

7. Сморжевский В.И. Наследственные тромбофилии - основные формы и особенности диагностики //Кровообіг та гемостаз. - 2006. - № 2. - С. 5-10.

8. Юзько О.М. Аспекти генетичних детермінант тромбофілій у розвитку акушерських ускладнень //Здоровье женщины. - 2012. - № 3. - С. 112-115.

9. Al Sallout R.J. Polymorphisms in NOS3, ACE and PAI-1 genes and risk of spontaneous recurrent miscarriage in the Gaza Strip /R. J. Al Sallout, F.A. Sharif //Med. Princ. Pract. - 2010. - Vol. 19, № 2. - P. 99-104.

10. Bura-Riviere A. Thrombophilia and pregnancy /A. Bura-Riviere //Rev. Prat. - 2012. - Vol. 62, № 7. - P. 937-942.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозування ризику невиношування вагітності, що включає проведення клінічних та лабораторних досліджень, який **відрізняється** тим, що додатково проводять молекулярно-генетичне тестування мутації гена інгібітора активатора плазміногену 1 675 5G/4G в лейкоцитах периферійної крові, потім методом полімеразної ланцюгової реакції проводять ампліфікацію послідовностей ДНК in vitro, виявляють поліморфізм гена, порівнюють з контролем і прогнозують ризик невиношування вагітності.

---

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

---

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