



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **69262** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/48 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2011 11703	(72) Винахідник(и): Лоскутова Ірина Володимирівна (UA), Бічевська Роза Газизянівна (UA), Германов Володимир Тимофійович (UA)
(22) Дата подання заявки: 04.10.2011	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.04.2012	(73) Власник(и): Лоскутова Ірина Володимирівна, кв. 50-річчя Оборони Луганська, 5, кв. 10, м. Луганськ, 91045 (UA), Бічевська Роза Газизянівна, пр. Ілліча, 21-а, кв. 18, м. Донецьк, 83000 (UA), Германов Володимир Тимофійович, вул. Брестська, 7, кв. 73, м. Луганськ, 91054 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.04.2012, Бюл.№ 8	

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ВИКИДНІВ У РАННІЙ ТЕРМІН ВАГІТНОСТІ У ЖІНОК З НЕВИНОШУВАННЯМ В АНАМНЕЗІ

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування викиднів у ранній термін у жінок з невиношуванням вагітності шляхом проведення аналізу крові з подальшою інтерпретацією отриманих результатів. Додатково вивчають імунологічні та біохімічні показники у сироватці крові.

UA 69262 U

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме до способів діагностики перебігу вагітності.

Актуальність проблеми пов'язана з високим рівнем репродуктивних втрат, що складає суттєву частину перинатальної захворюваності та смертності. Порухення регуляції імунної системи при погрозі переривання вагітності розвивається ще до клінічної маніфестації. Тому пошук імунологічних предикторів невиношування вагітності (НВ) для прогнозування акушерської патології необхідно враховувати в обстеженні вагітних.

Існує спосіб прогнозування НВ за даними клінічного та інструментального обстеження. При цьому розвиток викиднів прогнозується у жінок з наявністю вірусного або/та бактеріального інфікування, з виявленою генетичною патологією (хромосомно-аномальних зародків), гормональними дисфункціями (гіпофункція яєчників, гіперандрогенія, захворювання щитовидної залози), патологія матки (вади розвитку, міома) (Сидельникова В.М. Привычная потеря беременности - М.: Триада-Х, 2005. - С. 113-141). Однак при даному способі прогнозування його ефективність не перевищує 30-50 %, тобто спосіб недостатньо точний.

Для підвищення ефективності існуючого способу пропонується підраховувати дані лабораторного обстеження хворих: розвиток переривання вагітності прогнозується при наявності суттєвих зсувів з боку периферійної крові - лейкопенії або лейкоцитозу, лімфоцитозу, нейтрофіліозу (Чистякова Г.Н., Газиєва И.А. Использование интегральных гематологических индексов для оценки степени аутоинтоксикации организма беременной // Клиническая лабораторная диагностика. - 2005. - № 12. - С. 35-37). Однак цей спосіб не враховує стан системного імунітету у вагітних жінок.

Основна роль імунної системи в патології НВ реалізується через зміни клітинної та гуморальної ланки із порушенням функціональної активності клітин: активація Т-клітинної ланки імунного гомеостазу, збільшення концентрації сироваткового Ig G (Д.Е. Барковский Прогнозирование невынашивания беременности на основе оценки иммунного статуса беременных // Здоровье женщины. - 2004. - № 1 (17). - С. 32-36). Цей спосіб вибраний як прототип.

Однак цей спосіб не забезпечує раннього прогнозування виникнення викидня, оскільки більш значущі зсуви імунологічних показників уявляються лише при вже існуючому ускладненні.

Задача корисної моделі - підвищення ефективності способу прогнозування виникнення викиднів у ранній термін вагітності у жінок з НВ в анамнезі.

Для реалізації задачі корисної моделі авторами заявки пропонується досліджувати такі параметра в крові: загальний рівень циркулюючих імунних комплексів (ЦІК), показник "середніх молекул" (СМ), рівень прозапального цитокіну (туморнекротизуючого фактора - $TNF\alpha$) та рівень протизапального цитокіну IL-4. При концентрації ЦІК 3,5 г/л і більше, СМ - 2,8 г/л і більше, $TNF\alpha$ - зростання удвічі і більше, IL-4 - в межах референтної норми або помірно зростання, з вірогідністю 89,2±2,8 % прогнозувати розвиток викидня у ранній термін у жінок з НВ в анамнезі.

При розробці корисної моделі авторами було вивчена низка імунологічних та біохімічних показників - рівень клітинних та гуморальних тестів (кількість Т- та В-клітин; субпопуляцій Т-лімфоцитів - Т-хелперів/індукторів, Т-супресорів/кілерів, вміст імуноглобулінів класів А, М, G, показники фагоцитарної активності моноцитів - ФАМ, цитокіновий профіль крові), рівень білків та білкових фракцій та інші. Ці дані порівнювались у двох групах жінок з НВ в анамнезі - перша з виниклим викиднем (38 жінка) та другої - з фізіологічною вагітністю (56 осіб) в динаміці. Таким чином, вивчення лабораторних показників було проведено в першій групі обстежених, ще до викидня. При цьому встановлено, що існує вірогідна різниця між імунологічними показниками груп жінок з НВ в анамнезі, в яких потім був діагностовано викидень (перша група) та з фізіологічною вагітністю (друга група). Дані імунологічного обстеження хворих, які були під наглядом, узагальнені в таблицях 1 (стосовно клітинних показників імунітету) і 2 (показників ЦІК, цитокінів, СМ).

Таблиця 1

Імунологічні показники	Норма	Групи обстежених жінок		P
		Перша (n=38)	Друга (n=56)	
CD3+, % г/л	72,5±1,8 1,36±0,05	54,6±2,1* 0,88±0,03**	69,6±1,9 1,16±0,03**	<0,05 <0,05
CD4+, % г/л	45,3±1,3 0,85±0,03	48,4±2,8 0,78±0,04	42,2±2,0 0,7±0,03*	<0,05 >0,1
CD8+, % г/л	22,1±0,7 0,42±0,02	20,2±0,9 0,33±0,01*	19,8±1,0* 0,33±0,02	=0,05 >0,1
CD4/CD8	2,05±0,06	2,4±0,02*	2,1±0,07	<0,05
CD22+ % г/л	22,5±0,6 0,42±0,03	23,2±0,9 0,38±0,02	21,4±0,9 0,36±0,02	>0,05 >0,05
РБТЛ з ФГА, %	62,2±1,9	47,2±0,9**	59,3±1,4	<0,01
ФАМ: ФІ	28,6±0,8	18,7±0,8**	23,5±0,6*	<0,05
ФЧ	4,0±0,15	3,0±0,1*	3,2±0,1*	>0,05
ФА	14,0±0,6	10,5±0,7*	12,2±0,5	>0,05
ІП	26,5±0,9	15,5±0,6**	21,8±0,9	<0,05

Примітка: в табл. 1 та 2 вірогідність різниці показників вирахована між показником групи та нормою при P<0,05 - *; P<0,01 - ** та P<0,001 - ***; P - між показниками в групах

- 3 таблиці 1 та 2 впливає, що між вказаними групами має місце вірогідна різниця за такими параметрами: кількісний рівень CD3⁺, CD4⁺ лімфоцитів, коефіцієнт CD4/CD8, показники фагоцитарної активності моноцитів (ФАМ) - фагоцитарний індекс (ФІ), фагоцитарне число (ФЧ), індекс атракції (ІА) та індекс перетравлення (ІП), загальний рівень ЦІК, концентрація СМ, рівень прозапального цитокіну TNFα та протизапальний цитокін ІЛ-4.

Таблиця 2

Показники ЦІК, цитокінів та СМ в обстежених жінок з НВ в анамнезі

Показники	Норма	Групи обстежених жінок		P
		перша (n=38)	друга (n=56)	
ЦІК заг., г/л	1,88±0,09	3,68±0,15**	2,24±0,15*	<0,05
великомолекулярні, % г/л	47,2±1,9 0,89±0,05	22,6±0,15** 0,83±0,06	40,9±1,8* 0,92±0,06	<0,05 >0,05
середньомолекулярні, % г/л	31,3±1,2 0,59±0,04	43,6±2,9* 1,6±0,08***	35,6±2,5 0,8±0,08*	>0,05 <0,05
дрібномолекулярні, % г/л	21,5±0,9 0,4±0,03	33,8±2,5* 1,25±0,09***	23,5±1,0 0,52±0,03*	<0,05 <0,01
TNFα, пг/мл	34,1±2,7	129,7±7,9**	53,7±3,9*	<0,01
ІЛ-4, пг/мл	27,5±2,0	34,8±4,5	53,2±4,2**	<0,05
TNFα/ІЛ-4	1,24±0,2	3,72±0,8*	1,01±0,3	<0,01
СМ, г/л	0,53±0,06	3,28±0,15***	1,26±0,18***	<0,01

- 10 Для виявлення найбільш суттєвих показників, які відрізняються у цих двох групах обстежених жінок з НВ в анамнезі в періоді вагітності, було застосовано математичний аналіз з застосуванням сучасних комп'ютерних технологій. Кожен обстежений хворий обох груп був математично описаний 18 ознаками, які переважно характеризують імунний статус пацієнта.
- 15 При цьому, якщо у хворого мала місце та чи інша з вказаних ознак, вона була визначена як 1, якщо ознака була відсутня - 0. Отже, в результаті обрахування чисельних даних будували дві бінарні таблиці для класів ознак А1 та А2, після чого починали оцінювали значущість різниць, початку виділяли ті ознаки, різниця між якими є статистично значуща. З цією метою було використано точний метод Фішера, оскільки критерій Фішера може бути пристосовуватися для даних, які представлені двома градаціями (1 або 0, тобто "так" чи "ні").

При використанні точного методу Фішера нами за допомогою комп'ютера було збудовано чотирипольна таблиця для кожної з вивчених ознак: В цій таблиці: а - кількість значень з класу А1, в яких ознака спостерігалась, в яких ознак спостерігалась, b - кількість значень з класу А1, в яких ознака була відсутня.

- 5 Для класу А2 с - кількість значень з позитивною ознакою, d - з негативною, тобто з її відсутністю. В подальшому підраховували імовірність прийняття невірної гіпотези для кожної з ознак.

Класи	Ознака (+)	Ознака (-)
A1	a	b
A2	c	d

- 10 Розрахунок проводили за таблицями факторіалів; для оцінки наскільки різняться розподіл ознак, здійснювали міру інформативності Кульбака за формулою:

$$J(x_i) = 10 \times \lg \frac{P(x_i / A1)}{P(x_i / A2)} \times 0,5 [P(x_i / A1) - P(x_i / A2)].$$

- Отримані нами дані при підрахуванні результатів лабораторного обстеження хворих обох груп узагальнені в таблиці 3 як фактори ризику виникнення викидня у жінок з НВ в анамнезі. При цьому із 19 вивчених показників значущими в плані прогнозування розвитку запальних ускладнень виявились 14, які і представлені в таблиці. З них найбільш висока міра Кульбака була у трьох з показників: середньомолекулярної фракції ЦІК 1,2 г/л та більше, концентрації СМ \geq 2,8 г/л та інтегральний індекс співвідношення прозапального до протизапального цитокінів \geq 2,2, які мали міру Кульбака відповідно 0,7131, 0,7236 та 0,7329. Оці три лабораторних показники і виділені як найбільш значущі при прогнозуванні виникнення викидня.

Виходячи з вищевикладеного, технічно спосіб здійснюється таким чином: у жінок з НВ в анамнезі беруть кров з вени, з якої виділяють сироватку для вивчення концентрації ЦІК, СМ та цитокінів.

- Концентрацію ЦІК та рівень СМ вивчають за допомогою загальноприйнятих методів (для ЦІК - див. Фролов В.М., Рычнев В.Е. Исследование циркулирующих иммунных комплексов их диагностическое, и прогностическое значение // Лаборат. дело. - 1986. - № 3.- С. 159-161; для СМ - Николайчик В.В. Способ определения "средних молекул" / Николайчик В.В., Моин В.М., Кирковский В.В. // Лаборат. дело. - 1991. - № 10. - С. 13-18). Визначення концентрації цитокінів у сироватці крові проводили за допомогою імуноферментного аналізатора і використовували реагенти виробництва "ProCon" ("Протеиновый контур"; СПб). Донорам (жінкам) контрольної групи проводили одноразове дослідження ЦК. Кількісна оцінка результатів проводилася методом побудови каліброваної кривої, що відбиває залежність оптичної щільності від концентрації для стандартного антигену і яка дозволяє порівнювати з ним досліджувані зразки. Дослідження проводились за методиками виробника.

35

Таблица 3

Фактори ризику виникнення викидню у жінок з НВ в анамнезі

№№ класу ознак	Фактори ризику ускладнень	Міра Кульбака
A1	CD3+<50, %	0,6843
A2	CD4+>46,	0,6457
A3	CD4/CD8>2,1	0,5636
A4	ФІ<12	0,6229
A5	ФЧ<2	0,5823
A6	ІА<8	0,5892
A7	ІП<10	0,6225
A8	ЦІК>3,0 г/л	0,6923
A9	середньомолекулярні ЦІК>1,2 г/л	0,7131
A10	дрібномолекулярні ЦІК>1,0 г/л	0,6818
A11	TNF α пг/мл	0,6728
A12	ІЛ-4 пг/мл	0,6642
A13	TNF α /ІЛ-4 \geq 2,2	0,7329
A14	СМ \geq 2,8 г/л	0,7236

Для підтвердження запропонованого способу прогнозування викиднів у жінок з НВ в анамнезі, було обстежено паралельно за допомогою існуючого та заявленого способу 76 вагітних жінок, з яких у 31 потім виникли викидні, а у 45 вони були відсутні. Отримані дані в залежності від результатів прогнозування - позитивних або негативних - згруповані у таблиці 4.

Таблиця 4

Інформативність існуючого способу-прототипу та заявленого способу прогнозування викиднів у жінок з НВ в анамнезі ($m \pm M$)

Обстежені групи жінок	Збіг прогнозу		Відсутність збігу прогнозу	
	Існуючий спосіб	Заявлений спосіб	Існуючий спосіб	Заявлений спосіб
З викиднем ($n=31$)	8 $25,8 \pm 1,5$	18 $58,4 \pm 1,8$	3 $9,7 \pm 0,9$	2 $6,5 \pm 0,8$
З відсутністю викидня ($n=45$)	12 $31,1 \pm 2,2$	24 $53,3 \pm 1,9$	6 $13,3 \pm 1,1$	3 $6,7 \pm 0,9$
Усі обстежені ($n=76$)	20 $26,3 \pm 2,0$	42 $55,3 \pm 2,2$	10 $11,8 \pm 1,1$	5 $6,6 \pm 1,1$
P	<0,05		<0,01	

З таблиці видно, що використання існуючого способу-прототипу в групі жінок з викиднем обумовлює збіг прогнозу в $25,8 \pm 1,5$ %, тоді як в $9,7 \pm 0,9$ % згідно з прогнозом не було (помилково негативні результати прогнозу). Використання заявленого способу в $58,4 \pm 1,8$ % випадків, відсутність збігу (помилково негативні результати) в $6,5 \pm 0,8$ % випадків.

В групі жінок з НВ в анамнезі і фізіологічною вагітністю використання існуючого способу обумовлює збіг прогнозу в $31,1 \pm 2,2$ % випадків, тоді як заявлений спосіб - $53,3 \pm 1,9$ % ($P < 0,01$). Відсутність збігу прогнозу, тобто помилково позитивні результати відмічено у $13,3 \pm 1,1$ % жінок при застосуванні існуючого способу-прототипу і тільки у $6,7 \pm 0,9$ % при використанні заявленого способу. Сумарно серед усіх обстежених збіг прогнозу при використанні існуючого способу склав $26,3 \pm 2,0$ %, заявленого - $55,3 \pm 2,2$ % ($P < 0,05$). Відсутність збігу прогнозу, тобто помилково позитивні результати відмічено у $11,8 \pm 1,1$ % жінок при застосуванні існуючого способу-прототипу і у $6,6 \pm 1,1$ % при використанні заявленого способу.

Отже, проведені порівняльні обстеження свідчать, що заявлений спосіб має переваги у порівнянні зі способом прототипом, які полягають в більшій інформативності заявленого способу при порівнянні з існуючим в 2,1 рази.

Використання заявленого способу буде сприяти сучасному призначенню профілактичного лікування жінок з НВ в період предгравідарної підготовки, і, таким чином, зменшенню кількості викиднів.

Наводимо конкретні приклади використання запропонованого способу прогнозування запальних ускладнень з боку статевих залоз у чоловіків, хворих на ЕП.

Приклад 1

Вагітна К., 23 років, студентка. В анамнезі - три роки тому відмічався викидень у термін 9 тижнів. Обстежена - виключено наявність бактеріально-вірусної інфекції урогенітального тракту, генетично здорова, гормональний фон без особливостей. Консультація терапевта - хронічний неалкогольний стеатогепатит. Висновок - вагітність, 8 тижнів.

Для прогнозування можливості викидня проведено додаткове обстеження вагітної. Отримані результати: концентрація ЦІК у сироватці крові $3,3$ г/л (середньомолекулярна фракція ЦІК - $42,2$ %, $1,39$ г/л) рівень СМ - $2,8$ г/л, $\text{TNF}\alpha$ - $96,4$ пг/мл, IL-4 - $32,3$ пг/мл ($\text{TNF}\alpha/\text{IL-4}$ - $2,99$). Отже, виходячи з даних лабораторного обстеження, можна спрогнозувати розвиток викидня у К. Дійсно, через 2 тижні у неї діагностовано викидень у ранній термін.

Приклад 2

Вагітна С., 29 років, домогосподарка. Вагітність 7 тижнів. В анамнезі - рік тому викидень в 8 тижнів. Обстежена - виключено наявність бактеріально-вірусної інфекції урогенітального тракту, генетично здорова, гормональний фон без особливостей. Консультація терапевта - хронічний некалькульозний холецистит в стадії нестійкої ремісії.

З метою прогнозування можливості викидня жінка обстежена додатковим вивчення лабораторних показників. Отримані результати: концентрація ЦІК у сироватці крові $3,13$ г/л (середньомолекулярна фракція ЦІК - $39,8$ %, $1,25$ г/л), рівень СМ - $2,98$ г/л, $\text{TNF}\alpha$ - $78,8$ пг/мл, IL-

4 - 24,7 пг/мл ($\text{TNF}\alpha/\text{IL-4}$ - 3,19). Виходячи з цих даних у жінки прогнозовано викидень. При подальшому спостереженні встановлено викидень на 11 тижні вагітності.

Отже, заявлений спосіб має переваги перед існуючим і може використовуватися в клінічній практиці. Проведення вказаних аналізів можливо в умовах клініко-діагностичних лабораторій, причому вже й тепер в більшості з цих лабораторій визначається концентрація СМ і ЦІК. Спосіб не потребує дефіцитного обладнання і реактивів. Тому він може пропонуватися для практичного застосування у жіночих консультаціях та центрах охорони материнства та дитинства.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

10

1. Спосіб прогнозування викиднів у ранній термін у жінок з невиношуванням вагітності шляхом проведення аналізу крові з подальшою інтерпретацією отриманих результатів, який **відрізняється** тим, що додатково вивчають імунологічні та біохімічні показники у сироватці крові.

15

2. Спосіб за п. 1 який **відрізняється** тим, що вивчають концентрацію у сироватці крові циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) та "середніх молекул" (СМ), а також цитокінів у крові, і при рівні ЦІК 3,0 г/л та більше, СМ - 2,8 г/л та вище та значеннях індексу $\text{TNF}\alpha/\text{IL-4}$ 2,2 і більше з вірогідністю $55,3 \pm 2,2$ % прогнозують викидень.

Комп'ютерна верстка В. Мацело

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