



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 15/00 (2020.08); C12Q 1/68 (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2020127471, 17.08.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
17.08.2020

Дата регистрации:
21.01.2021

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 17.08.2020

(45) Опубликовано: 21.01.2021 Бюл. № 3

Адрес для переписки:
443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89,
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Самарский государственный
медицинский университет" Министерства
здравоохранения Российской Федерации

(72) Автор(ы):
Каганова Мария Александровна (RU),
Спиридонова Наталья Владимировна (RU),
Безрукова Алина Андреевна (RU),
Галкина Дарья Анатольевна (RU),
Девятова Ольга Олеговна (RU),
Медведчикова-Ардия Лали Корнелевна
(RU),
Медникова Ольга Михайловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Самарский государственный
медицинский университет" Министерства
здравоохранения Российской Федерации
(RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2620153 C1, 23.05.2017. SHA
HUANG, et al, Maternal lead exposure and
premature rupture of membranes: a birth cohort
study in China. BMJ Open 2018; doi:10.1136/
bmjopen-2018-021565, p.1-7. КНЯЗЕВА Т.П,
Причины и факторы риска преждевременного
разрыва плодных оболочек, Дальневосточный
медицинский журнал; 2016, 2, с. 128-135.

(54) Способ оценки риска преждевременного разрыва плодных оболочек у беременных

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Изобретение представляет собой способ оценки риска преждевременного разрыва плодных оболочек у беременных, включающий выполнение соскоба эпителия цервикального канала, оценку местного иммунного статуса на основании определения с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени уровня экспрессии мРНК генов цитокинов, где у беременных при сроке гестации 37 недель и более определяют уровни экспрессии мРНК генов IL-18 и TLR-2, нормированных на референсный ген

B2M; на основании полученных результатов вычисляют риск преждевременного разрыва плодных оболочек P по формуле: $P=1/1+e^{-(0,92 \times X1 + 88,2 \times X2)}$, где X1 - значение уровня экспрессии мРНК гена IL-18 в относительных единицах; X2 - значение уровня экспрессии мРНК гена TLR-2 в относительных единицах; при значении P, большем или равном 0,5, риск оценивают как высокий; при значении P меньше 0,5 - как низкий. Изобретение позволяет оценить риск преждевременного разрыва плодных

оболочек у беременных при сроке гестации 37 недель и более. 2 пр.

R U 2 7 4 0 9 5 0 C 1

R U 2 7 4 0 9 5 0 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 15/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
C12N 15/00 (2020.08); C12Q 1/68 (2020.08)

(21)(22) Application: **2020127471, 17.08.2020**

(24) Effective date for property rights:
17.08.2020

Registration date:
21.01.2021

Priority:

(22) Date of filing: **17.08.2020**

(45) Date of publication: **21.01.2021 Bull. № 3**

Mail address:

**443099, g. Samara, ul. Chapaevskaya, 89,
Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Samarskij gosudarstvennyj
meditsinskij universitet" Ministerstva
zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii**

(72) Inventor(s):

**Kaganova Mariya Aleksandrovna (RU),
Spiridonova Natalya Vladimirovna (RU),
Bezrukova Alina Andreevna (RU),
Galkina Darya Anatolevna (RU),
Devyatova Olga Olegovna (RU),
Medvedchikova-Ardiya Lali Kornelevna (RU),
Mednikova Olga Mikhajlovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Samarskij gosudarstvennyj
meditsinskij universitet" Ministerstva
zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii (RU)**

(54) METHOD FOR ASSESSING THE RISK OF PREMATURE RUPTURE OF MEMBRANES IN PREGNANT WOMEN

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention represents a method for assessing the risk of premature rupture of fetal membranes in pregnant women, involving a cervical epithelial scraping, assessing the local immune status based on real-time polymerase chain reaction analysis of cytokine gene mRNA expression level, wherein in pregnant women with a gestation period of 37 weeks or more, the expression levels of mRNAs of IL-18 and TLR-2 genes normalized to the reference B2M gene are determined; based on obtained results, risk of

premature rupture of fetal membranes P is calculated by formula: $P=1/1+e^{-(0.92 \times X1+88.2 \times X2)}$, where X1 is the level of mRNA expression of the IL-18 gene in relative units; X2 is TLR-2 gene mRNA expression level in relative units; if P is greater than or equal to 0.5, the risk is considered to be high; at P value less than 0.5 - as low.

EFFECT: invention enables assessing the risk of premature rupture of fetal membranes in pregnant women with a gestation period of 37 weeks or more.

1 cl, 2 ex

RU 2 740 950 C 1

RU 2 740 950 C 1

Изобретение относится к медицине, а именно к такой ее области, как акушерство и гинекология, и предназначено для оценки риска преждевременного разрыва плодных оболочек (ПРПО) у беременных.

Актуальность заявляемого способа определяется тем, что несвоевременное излитие околоплодных вод - часто встречаемое осложнение беременности и составляет от 2,7 до 17% случаев (1, 2). Развитие патологии приводит к высокой частоте осложнений со стороны матери: аномалиям родовой деятельности, гипо- и атоническим кровотечениям, травматизму мягких тканей родовых путей, инфекциям; со стороны плода - инфекционным осложнениям, неврологическим нарушениям (3).

Известен способ прогнозирования ПРПО с помощью определения активности нейраминидазы во влагалище. У беременной проводят забор содержимого влагалища и определяют в нем активность нейраминидазы, при величине активности фермента 2,5 ммоль/л и выше прогнозируют ПРПО (4).

Недостатком способа является низкая точность оценки риска ПРПО, т.к. фермент нейраминидаза не является специфичным для ПРПО.

Известен способ прогнозирования преждевременного излития околоплодных вод по определению в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа уровня IL-8. При его значении равном или менее 15,4 нг/мл прогнозируют ПРПО (5).

Недостатком способа является низкая специфичность, т.к. цитокины являются локальными медиаторами, исследование их в сыворотке крови менее информативно, чем определение в самом очаге.

Известен способ прогнозирования преждевременных родов по профилю экспрессии генов врожденного иммунитета в клетках цервикального канала. Сущность способа заключается в том, что у беременной женщины берут соскоб эпителия цервикального канала и с помощью ПЦР определяют соотношения уровней экспрессии мРНК генов TLR4/CD68 и TNF/GATA3 (6).

Недостатком способа является его низкая специфичность и чувствительность в отношении прогноза при ПРПО при доношенной беременности. Этот способ выбран нами в качестве прототипа.

Целью изобретения является создание способа оценки риска ПРПО у беременных в сроке гестации 37 недель и более.

Эта цель достигается тем, что у беременных при сроке гестации 37 недель и более определяют уровни экспрессии мРНК генов IL-18 и TLR-2, нормированных на референсный ген B2M; вычисляют риск преждевременного разрыва плодных оболочек Р по формуле: $P = 1 / (1 + e^{-(0,92 \times X1 + 88,2 \times X2)})$, где X1 - значение уровня экспрессии мРНК гена IL-18 в относительных единицах; X2 - значение уровня экспрессии мРНК гена TLR-2 в относительных единицах; при значении Р большем или равном 0,5 риск оценивают, как высокий; при значении Р меньше 0,5 как низкий.

Способ разработан на основании определения у 40 беременных в сроке гестации 37 недель и более в соскобе из цервикального канала с помощью ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени уровней экспрессии мРНК генов IL-6, IL-18, TLR2, PTGS, MMP9, CD68, GATA3, нормализованных по референсному гену B2M. Из них у 25 беременных был диагностирован ПРПО, а 15 вступили в роды с целым плодным пузырем.

При сравнении полученных данных с применением методов математической статистики (логистическая регрессия) построена математическая модель, с помощью которой были выявлены наиболее значимые маркеры: уровень экспрессии мРНК генов IL-18 (статистика Вальда=4,12; p=0,042), TLR2 (статистика Вальда=8,04; p=0,005), на

основании которых были рассчитаны риски ПРПО для каждого случая. Расчет риска ПРПО проводится с помощью бинарной логистической регрессии, что существенно повышает точность способа.

Вычисляют риск ПРПО P по формуле:

5 $P=1/1+e^{-(0,92 \times X1+88,2 \times X2)}$, где $X1$ - значение уровня экспрессии мРНК гена IL-18 в относительных единицах; $X2$ - значение уровня экспрессии мРНК гена TLR-2 в относительных единицах; при значении P большем или равном $0,5$ риск оценивают, как высокий; при значении P меньше $0,5$ как низкий.

10 Константы $-0,92$; $88,2$ - коэффициенты уравнения бинарной логистической регрессии, полученные с применением пошагового исключения алгоритма Вальда на основе результатов исследования уровня экспрессии генов мРНК генов TLR-2 и IL-18 . Точность модели составляет $82,5\%$, чувствительность (Se) - $88,0\%$, специфичность (Sp) - $73,3\%$.

15 Предлагаемый способ позволяет оценить риск преждевременного разрыва плодных оболочек. Сравнение предлагаемого способа с другими, известными в медицине, показало его соответствие критериям изобретения.

Изобретение реализуется следующим образом. У женщин со сроком гестации 37 недель и больше выполняют соскоб эпителия цервикального канала, оценку местного иммунного статуса на основании определения с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени уровня экспрессии мРНК генов IL-18 и TLR-2 ,
20 нормированных на референсный ген B2M . На основании полученных результатов вычисляют риск преждевременного разрыва плодных оболочек P по формуле: $P=1/1+e^{-(0,92 \times X1+88,2 \times X2)}$, где $X1$ - значение уровня экспрессии мРНК гена IL-18 в относительных единицах; $X2$ - значение уровня экспрессии мРНК гена TLR-2 в относительных единицах;
25 при значении P большем или равном $0,5$ риск оценивают, как высокий; при значении P меньше $0,5$ как низкий. Способ поясняется клиническими примерами.

30 Пример 1: Беременная, 28 лет, в сроке беременности $39,5$ недель. Данная беременность 3 , в анамнезе самопроизвольный и медицинский аборт, бактериальный вагиноз, соматически здорова. По УЗИ и УЗДГ со стороны плода и плаценты отклонений не выявлено. Плод один, в головном предлежании, кардиотокограмма в норме. Взят мазок из цервикального канала на мРНК: $\text{IL-18}=5$ отн.ед., $\text{TLR2}=0,02$ отн.ед.

$P=1/1+e^{-(0,92 \times X1+88,2 \times X2)}=1/1+e^{-(0,92 \times 5+88,2 \times 0,02)}=0,05$ Поскольку значение P меньше $0,5$ делается вывод о низком риске преждевременного разрыва плодных оболочек.

35 Пациентка вступила в роды без преждевременного излития околоплодных вод и в дополнительных назначениях не нуждалась, это свидетельствовало о правильном расчете риска преждевременного разрыва плодных оболочек.

40 Пример 2: Беременная, 24 лет, в сроке беременности $39,0$ недель. Данная беременность 1 , абортов, самопроизвольных выкидышей не было, соматически здорова. В анамнезе хронический сальпингоофорит, в первой половине беременности признаки угрозы прерывания, по поводу чего получала препараты прогестерона. По УЗИ и УЗДГ со стороны плода и плаценты отклонений не выявлено. Плод один, в головном предлежании, кардиотокограмма в норме. Взят мазок из цервикального канала на мРНК: $\text{IL-18}=0,02$ отн.ед., $\text{TLR2}=2$ отн.ед.

45 $P=1/1+e^{-(0,92 \times X1+88,2 \times X2)}=1/1+e^{-(0,92 \times 0,02+88,2 \times 2)}=1,0$. Поскольку значение P больше $0,5$ делается вывод о высоком риске преждевременного разрыва плодных оболочек.

Данная пациентка была госпитализирована в стационар, взят посев на флору и чувствительность к антибиотикам, в том числе на β -гемолитический стрептококк, и начата санация влагалища, направленная на нормализацию микрофлоры. В течение

суток у данной пациентки отошли околоплодные воды при наличии недостаточно зрелой шейки матки до начала родовой деятельности. Это свидетельствовало о правильном расчете риска преждевременного разрыва плодных оболочек.

Таким образом, предлагаемый способ позволяет оценить риск преждевременного разрыва плодных оболочек. Изобретение целесообразно использовать в клинической практике гинекологических консультаций и стационаров для профилактики данного осложнения во время беременности и выбора оптимальной тактики ведения пациенток.

Источники информации

1. Князева Т.П. Причины и факторы риска преждевременного разрыва плодных оболочек. Дальневосточный медицинский журнал; 2016, 2, с. 128-135.
2. Sha Huang, Wei Xia, Xia Sheng, Lin Qiu, Bin Zhang, Tian Chen et al. Maternal lead exposure and premature rupture of membranes: a birth cohort study in China. BMJ Open 2018; doi:10.1136/bmjopen-2018-021565, p.1-7.
3. Prelabor rupture of membranes. ACOG Practice Bulletin No. 188. American College of Obstetricians and Gynecologists. Obstet Gynecol 2018;131:e1-14.
4. Патент RU 2014601 C1 от 15.06.1994, «СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОГО РАЗРЫВА ПЛОДНЫХ ОБОЛОЧЕК».
5. Патент RU (11) 2405453(13) C1 от 10.12.2010. «СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОГО ИЗЛИТИЯ ОКОЛОПЛОДНЫХ ВОД У БЕРЕМЕННЫХ»
6. Патент RU 2620153(13) C1 от 23.05.2017: «ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ПРЕЖДЕВРЕМЕННЫХ РОДОВ ПО ПРОФИЛЮ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА В КЛЕТКАХ ЦЕРВИКАЛЬНОГО КАНАЛА».

(57) Формула изобретения

Способ оценки риска преждевременного разрыва плодных оболочек у беременных, включающий выполнение соскоба эпителия цервикального канала, оценку местного иммунного статуса на основании определения с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени уровня экспрессии мРНК генов цитокинов, отличающийся тем, что у беременных при сроке гестации 37 недель и более определяют уровни экспрессии мРНК генов IL-18 и TLR-2, нормированных на референсный ген B2M; на основании полученных результатов вычисляют риск преждевременного разрыва плодных оболочек P по формуле: $P=1/1+e^{-(0,92 \times X1 + 88,2 \times X2)}$, где X1 - значение уровня экспрессии мРНК гена IL-18 в относительных единицах; X2 - значение уровня экспрессии мРНК гена TLR-2 в относительных единицах; при значении P, большем или равном 0,5, риск оценивают как высокий; при значении P меньше 0,5 - как низкий.