



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 33/00 (2019.02); G01N 33/48 (2019.02)

(21)(22) Заявка: 2018141092, 22.11.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.11.2018

Дата регистрации:
24.05.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 22.11.2018

(45) Опубликовано: 24.05.2019 Бюл. № 15

Адрес для переписки:

308036, Белгородская обл., г. Белгород, ул.
Победы, 85, ФГАОУ ВО "БГНИУ (БелГУ),
ОИС, Цуриковой Н.Д.

(72) Автор(ы):

Лебедева Ольга Петровна (RU),
Козаренко Олеся Николаевна (RU),
Пахомов Сергей Петрович (RU),
Жукова Ирина Олеговна (RU),
Дюмина Юлия Витальевна (RU),
Саушкина Татьяна Игоревна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет" (НИУ "БелГУ") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: О.П. ЛЕБЕДЕВА
ПРОГНОЗИРОВАНИЕ, РАННЯЯ
ДИАГНОСТИКА И ОБОСНОВАНИЕ
ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИОННО-
ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ
ГЕСТАЦИОННОГО ПРОЦЕССА /
Автореф. дисс. на соиск. уч. степ. д.м.н.,
Москва, 2014. Е.В. ДВОРЕЦКАЯ
ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ И
ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ
ПРОТИВОМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ
У ЖЕНЩИН С НЕРАЗВИВАЮЩЕЙСЯ
БЕРЕМЕННОСТЬЮ / Автореф. дисс. на
(см. прод.)

(54) Способ прогнозирования неразвивающейся беременности

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицинской диагностики, может быть использовано для прогнозирования неразвивающейся беременности. Способ прогнозирования неразвивающейся беременности включает выделение РНК из эпителиальных клеток цервикального канала на сроке 6-10 недель беременности, проведение обратной транскрипции с получением кДНК, определение

экспрессии TLR2, TLR10 и IDO с помощью количественной полимеразной цепной реакции, оценку возраста начала менархе и прогноз вероятности развития неразвивающейся беременности на основании уравнений, полученных по результатам дискриминантного анализа:

- для неразвивающейся беременности:
 $y_1 = 40,13 + (-1058,06 * x_1) + 56,10 * x_2 + 0,01 * x_3 + 5,8 * x_4$;
- для прогрессирующей беременности:
 $y_2 = -32,0163 + 80,7501 * x_1 + 24,1316 * x_2 + 0,0080 * x_3 + 5,1076 * x_4$,
где x_1 – уровень экспрессии мРНК TLR2
(отн.ед.), x_2 – уровень экспрессии мРНК TLR10

(отн.ед.), x_3 – уровень экспрессии мРНК IDO
(отн.ед.), x_4 – возраст менархе, при этом, если y_1
больше y_2 , прогнозируют высокий риск развития
неразвивающейся беременности, и если y_1 меньше
 y_2 , то прогнозируют нормальное течение
беременности. 3 табл.

(56) (продолжение):

соиск. уч. степ. к.м.н., Москва, 2012. RU 2560694 C1, 20.08.2015. RU 2540499 C1, 10.02.2015.

R U 2 6 8 9 1 6 5 C 1

R U 2 6 8 9 1 6 5 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G01N 33/00 (2019.02); G01N 33/48 (2019.02)(21)(22) Application: **2018141092, 22.11.2018**(24) Effective date for property rights:
22.11.2018Registration date:
24.05.2019

Priority:

(22) Date of filing: **22.11.2018**(45) Date of publication: **24.05.2019** Bull. № 15

Mail address:

**308036, Belgorodskaya obl., g. Belgorod, ul.
Pobedy, 85, FGAOU VO "BGNIU (BelGU), OIS,
Tsurikovej N.D.**

(72) Inventor(s):

**Lebedeva Olga Petrovna (RU),
Kozarenko Olesya Nikolaevna (RU),
Pakhomov Sergej Petrovich (RU),
Zhukova Irina Olegovna (RU),
Dyumina Yuliya Vitalevna (RU),
Saushkina Tatyana Igorevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Belgorodskij gosudarstvennyj
natsionalnyj issledovatel'skij universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**(54) **METHOD FOR PREDICTION OF A NON-DEVELOPING PREGNANCY**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medical diagnostics, can be used for prediction of non-developing pregnancy. Method for prediction of non-developing pregnancy involves RNA isolation from cervical channel epithelial cells at 6–10 weeks of pregnancy, reverse transcription to obtain cDNA, TLR2, TLR10 and IDO expression by a quantitative polymerase chain reaction, age estimate of menarche and prognosis of developing non-developing pregnancy on the basis of equations obtained by discriminant analysis: -for non-developing pregnancy: $y_1=40.13+(-1058.06*x_1)+56.10*x_2+0.01*x_3+5.8*x_4$; -for

progressing pregnancy: $y_2=-32.0163+80.7501*x_1+24.1316*x_2+0.0080*x_3+5.1076*x_4$, where x_1 TLR2 mRNA expression level (relative units), x_2 TLR10 mRNA expression level (relative units), x_3 is an IDO mRNA expression level (po units), x_4 – age of menarche, at that, if y_1 greater than y_2 , a high risk of developing a miscarriage is predicted, and if y_1 less than y_2 , normal course of pregnancy is predicted.

EFFECT: what is presented is a method for prediction of non-developing pregnancy.

1 cl, 3 tbl

Изобретение относится к области медицинской диагностики, может быть использовано для прогнозирования неразвивающейся беременности в I триместре.

Невынашивание беременности ранних сроков является одной из основных проблем в акушерстве и гинекологии, так как объединяет нарушения и в репродуктивной системе, и в организме женщины в целом (Тетруашвили Н.К., Агаджанова А.А. Программа обследования и предгестационной подготовки пациенток с привычным выкидышем (клиническая лекция). // Акуш. и гин. – 2012. - № 6. – С. 87-91). Своевременная профилактика данного осложнения может служить резервом для увеличения рождаемости.

Известно, что частота невынашивания беременности составляет 15% среди всех зарегистрированных случаев беременности, при этом около 80% из них приходится на I триместр (Carp H. J. A. Recurrent pregnancy loss: causes, controversies and treatment. // Informa, 2007. – 290 p). На самом деле число женщин с невынашиванием может быть несколько больше, так как часть самопроизвольных выкидышей происходит еще до обращения женщины к гинекологу в связи с фактом беременности (Радзинский В.Е., Димитрова В.И., Майскова И.Ю. Неразвивающаяся беременность // М.: Гэотар-медиа, 2009. – 208 с.).

Неразвивающаяся беременность представляет собой разновидность невынашивания беременности, при котором погибшее плодное яйцо какое-то время находится в полости матки без клинических проявлений. Это затрудняет своевременную диагностику, а также способствует возникновению коагулопатических кровотечений при выскабливании полости матки (Plotko E. E., Abakumova E. I. Missed abortion. The diagnosis and prevention of complications // Уральский медицинский журнал. – 2011. – №. 12. – С. 100-104). Неразвивающаяся беременность составляет от 45% до 88% в структуре невынашивания беременности ранних сроков (Богданова, Г. С., Зайдиева, З. С., Магомедханова, Д. М., Заякин, В. А., Назарова, Е. А. Невынашивание беременности: общий взгляд на проблему. // Медицинский совет. -2012. - №3. – С. 67-71).

Основной причиной неразвивающегося беременности, согласно заключению XVIII Всемирного конгресса акушеров-гинекологов (FIGO, 2006), является хронический эндометрит (Радзинский В.Е., Гордеев А.Н. Актуальные вопросы современного акушерства (по материалам XVIII конгресса FIGO, 2006 г.) // Акушерство и гинекология. 2007. №6. С. 83– 85). Однако в большинстве случаев при выявлении хронического эндометрита, являющегося причиной неразвивающегося беременности, специфический возбудитель выявить не удастся, что свидетельствует о неспецифическом характере воспаления в связи с изменениями местной иммунореактивности (Cakmak H., Taylor H.S. Implantation failure: molecular and clinical treatment // Hum. Reprod. Update. – 2011. - Vol. 17 (2). – P. 242-253).

Выбор определения экспрессии мРНК Толл-подобного рецептора (TLR) 2, TLR10, индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) в цервикальном канале, а также оценки возраста начала менструаций (менархе) в качестве диагностического метода неразвивающейся беременности связан с высокой специфичностью метода, так как TLR2 и TLR10 распознают неспецифические структуры (лиганды) микроорганизмов, а IDO представляет собой фермент, который катаболизирует триптофан по кинурениновому пути и тем самым способствует супрессии Т-клеточного звена иммунитета из-за образования токсичных для них продуктов катаболизма (Oosting M., Cheng, S. C., Bolscher, J. M., Vestering-Stenger, R., Plantinga, T. S., Verschuere, I. C., Kullberg, B. J. Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2014. – Т. 111. – №. 42. – С. E4478-E4484. Munn D. H., Mellor A. L. Indoleamine

2, 3 dioxygenase and metabolic control of immune responses //Trends in immunology. – 2013. – Т. 34. – №. 3. – С. 137-143). Возраст менархе является косвенным предиктором эндокринных нарушений, являющихся причиной бесплодия и невынашивания беременности (Серов В. Н., Кира Е. Ф., Аполихина И. А. Гинекология: руководство для врачей/под ред. ВН Серова, ЕФ Кира. М.: Литтерра – 2008. – 840 с.).

В литературе описаны особенности экспрессии мРНК TLR и IDO в цервикальном канале при самопроизвольных выкидышах и при невынашивании беременности в I триместре (без разделения на клинические подгруппы – пациенток с самопроизвольными выкидышами и неразвивающейся беременностью) (Лебедева О. П., Старцева Н. Ю., Пахомов С. П., Ивашова О. Н., Чурносков М. И. Экспрессия индоламин-2, 3-диоксигеназы у пациенток с самопроизвольными выкидышами ранних сроков// Проблемы репродукции. – 2012. - №5. – С. 112-114; Лебедева, О. П. Прогнозирование, ранняя диагностика и обоснование профилактики инфекционно-воспалительных осложнений гестационного процесса : дис. ... д-ра мед.наук / Москва: Впечатать, 2014. – 272 с.; Lebedeva O. P., Yakovleva O. N., Pakhomov S. P., Churnosov M. I., Korotkikh I. N., Enkova, E. V. Expression of indoleamine-2,3-dioxygenase mRNA in patients with spontaneous miscarriages at early stages of pregnancy// International Journal of Pharmacy and Technology. – 2016. - № 8(2). – P. 14157-14164). Также есть данные об особенностях экспрессии IDO в цервикальном канале у пациенток с привычным невынашиванием (Obayashi Y., Ozaki Y., Goto S., Obayashi S., Suzumori N., Ohyama F., Sugiura-Ogasawara M. Role of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan 2 3-dioxygenase in patients with recurrent miscarriage// American Journal of Reproductive Immunology. – 2016. – Vol. 75(1). – P. 69-77.).

Известен способ прогнозирования неразвивающейся беременности (RU № 2540499, публ. 10.02.2015), основанный на микроскопировании мазка, полученного из супернатанта аспирационной жидкости из полости матки или менструальных выделений. При обнаружении комплекса морфологических элементов, включающего токсические бляшки, языковые и дискообразные структуры, прогнозируют высокий риск развития неразвивающейся беременности. Однако данный способ является субъективным, не указана его чувствительность, информативность способа подтверждена только на небольшой выборке пациенток. Кроме того, способ можно применять только у небеременных женщин.

Известен способ прогнозирования неразвивающейся беременности (RU № 2531084, публ. 20.10.2014), для выполнения которого в супернатанте аспирационной жидкости из полости матки или менструальной крови определяют одновременно содержание карбонильных групп белков и малонового диальдегида. При значениях от 9,43 до 16,91 нмоль/мг карбонильных групп и от 0,71 мкмоль/л до 7,28 мкмоль/л малонового альдегида судят об отсутствии их повреждающего воздействия на эндометрий и плодное яйцо. При значениях карбонильных групп белков от 22,32 нмоль/мг и выше и при значениях малонового диальдегида более 7,28 мкмоль/л судят об их повреждающем воздействии на плодное яйцо и высоком риске развития неразвивающейся беременности. К недостатку данного способа можно отнести то, что прогнозировать развитие неразвивающейся беременности предлагается только в случаях обследования беременных женщин, у которых данное осложнение уже наступило, и у которых авторы берут материал при выскабливании полости матки.

Известен способ прогнозирования неразвивающейся беременности (RU №2560694, публ. 20.08.2015), при котором в сыворотке крови пациентки выявляют факторы риска, а именно: определяют наличие или отсутствие фракции иммуноглобулинов М или G к цитомегаловирусу методом иммуноферментного анализа; определяют наличие или

отсутствие морфологического элемента (токсические бляшки) в сыворотке крови путем нанесения ее в количестве 0,2 мл на поверхность предметного стекла в форме капли, высушивания при комнатной температуре в течение суток и микроскопирования полученных фаций; определяют уровень малонового диальдегида и карбонильных групп белков в менструальных выделениях из полости матки и по формуле, полученной методом бинарной логистической регрессии, вычисляют вероятность развития неразвивающейся беременности. Однако данный способ применим преимущественно для пациенток с цитомегаловирусной инфекцией, может использоваться только вне беременности (так как для его выполнения необходимо взятие менструальных выделений).

Подобным вышеописанному также является способ прогнозирования неразвивающейся беременности у пациенток с обострением цитомегаловирусной инфекции (RU №2541176, публ. 02.10.2015). В момент обострения цитомегаловирусной инфекции во время беременности определяют титр антицитомегаловирусных антител IgG и уровень кортизола в периферической крови и на основании этого прогнозируют риск неразвивающейся беременности. Однако данный способ можно использовать только у пациенток с обострением цитомегаловирусной инфекции во время беременности, что бывает достаточно редко.

Также существует способ прогнозирования неразвивающейся беременности у супружеских пар (RU №2454669, публ. 27.06.2012). Проводят генотипирование супругов на предмет выявления полиморфизма гена SOD2. При выявлении генотипа C/C или генотипа T/C хотя бы у одного из супругов прогнозируют высокую степень риска рецидива неразвивающейся беременности. Однако данный способ можно применять только при обследовании обоих супругов и только при наличии неразвивающейся беременности в анамнезе. Кроме того, данный способ позволяет прогнозировать неразвивающуюся беременность только у небольшой части пациенток, так как отсутствие данных генетических полиморфизмов не исключает развитие неразвивающейся беременности вследствие других причин.

Также известен способ прогнозирования неразвивающейся беременности (RU 313793, публ. 27.12.2007), для выполнения которого у женщин с 5 недель беременности в сыворотке крови определяют содержание фактора роста плаценты. При снижении его в 2,7 и более раз относительно нормы прогнозируют неразвивающуюся беременность. Однако чувствительность способа не указана, для ее определения не было проведено когортных исследований. Заключение об эффективности способа дано на основании единичных клинических наблюдений, в которых способ был использован не для прогнозирования, а для диагностики (установления свершившегося факта) неразвивающейся беременности. Кроме того, как указывают сами авторы, концентрация фактора роста плаценты может снижаться в ответ на любое осложнение беременности.

Также существует способ прогнозирования неразвивающейся беременности (RU №2465589, публ. 27.10.2012), при котором в крови беременных женщин определяют концентрацию фактора некроза опухоли альфа (ФНО- α), интерлейкина-1 бета (ИЛ-1 β), интерлейкина 6 (ИЛ-6). Дополнительно производят определение содержания лимфоцитов CD95+, уровня альфа-2-микроглобулина фертильности (АМГФ), концентрации фактора роста плаценты (ФРП) и общего IgE. На основании полученных данных делается вывод о риске неразвивающейся беременности. Однако следует отметить, что увеличение уровней провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6) в периферической крови может наблюдаться и при других состояниях (острые инфекционные заболевания, системные заболевания соединительной ткани и т.д.). Для

выполнения исследования используется большое число показателей, что делает его дорогостоящим. Кроме того, для определения лимфоцитов CD95+ количественным методом необходимо дорогостоящее оборудование – проточный цитометр. Кроме того, неясно, какое заключение следует делать в случае, если показатели имеют
5 разнонаправленные отклонения от нормы или если часть из них находится в пределах нормы.

Однако особенности экспрессии мРНК TLR и IDO в эпителии цервикального канала у пациенток только с неразвивающейся беременностью описаны не были. Также ранее в литературе не был описан способ прогнозирования неразвивающейся беременности
10 с помощью формулы, полученной методом дискриминантного анализа, на основании экспрессии в цервикальном канале мРНК TLR2, TLR10, IDO и оценки возраста менархе.

Задачей настоящего изобретения является разработка высокоточного способа прогнозирования неразвивающейся беременности на основании экспрессии мРНК TLR2, TLR10, IDO, а также оценке возраста начала менструальной функции (менархе),
15 пригодного для применения в амбулаторных условиях.

Технический результат - получение критериев оценки риска развития неразвивающейся беременности, позволяющих определить клинический прогноз и тактику ведения женщины на ранних сроках беременности, снизить экономические затраты и уменьшить количество койко-дней пребывания пациенток в гинекологическом
20 отделении.

В соответствии с поставленной задачей был разработан способ раннего прогнозирования неразвивающейся беременности, основанный на определении экспрессии мРНК TLR2, TLR10, IDO, а также оценке возраста менархе, включающий:
25 -выделение рибонуклеиновой кислоты (РНК) из эпителиальных клеток цервикального канала у женщин на ранних сроках беременности;
-обратную транскрипцию с получением кДНК;
-определение экспрессии TLR2, TLR10 и IDO с помощью количественной полимеразной цепной реакции;
- оценку возраста менархе на основании опроса пациентки;
30 -прогнозирование вероятности неразвивающейся беременности на основании уравнения, полученного по результатам дискриминантного анализа:

Для неразвивающейся беременности:

$$y_1 = 40,13 + (-1058,06 * x_1) + 56,10 * x_2 + 0,01 * x_3 + 5,8 * x_4$$

35 Для прогрессирующей беременности:

$$y_2 = -32,0163 + 80,7501 * x_1 + 24,1316 * x_2 + 0,0080 * x_3 + 5,1076 * x_4,$$

где x_1 – уровень экспрессии мРНК TLR2 (отн.ед.), x_2 - уровень экспрессии мРНК TLR10 (отн.ед.), x_3 - уровень экспрессии мРНК IDO (отн.ед.), x_4 – возраст менархе.

40 Если y_1 больше y_2 , пациентку следует отнести в группу высокого риска по развитию неразвивающейся беременности. Если y_1 меньше y_2 , то прогнозируется нормальное течение беременности.

Новизна и изобретательский уровень заключается в том, что в настоящее время не известна возможность раннего прогнозирования неразвивающейся беременности на основании определения экспрессии мРНК TLR2, TLR10, IDO в эпителии цервикального канала и оценки возраста менархе.

Способ осуществляют следующим образом:

Определение экспрессии мРНК TLR2, TLR10, IDO в эпителии цервикального канала

проводили методом количественной ПЦР в НИЛ «Молекулярная генетика человека» НИУ «БелГУ». Данные о возрасте менархе получали во время опроса пациенток и вносили в специально разработанный опросник.

5 Материалом для определения экспрессии TLR2, TLR10 и IDO с целью раннего прогнозирования неразвивающейся беременности являлись клетки эпителия цервикального канала. Способ был разработан с учетом руководства MIQE (Bustin S., Benes V., Garson G. et al. The MIQE Guidelines: Minimum information for publication of quantitative Real-Time PCR experiments.// Clin. Chem. – 2009. – №55, Vol. 4. – P. 611-622).

10 Взятие материала у беременных женщин проводили на сроке беременности 6-10 недель. Группу с неразвивающейся беременностью составили 50 пациенток с на сроке 6-10 недель, контрольную группу – 57 пациенток, которым был произведен медаборт на тех же сроках.

15 Шейку матки обнажали в зеркалах, стерильным тампоном удаляли слизь из цервикального канала. Затем с помощью цитощетки производили сбор материала (эпителиальные клетки цервикального канала) в пробирку Эппендорфа объемом 1,5 мл., содержащую 500 мкл. консервирующей среды RNeasy (Ambion, США).

При необходимости хранения после помещения материала в раствор RNeasy пробирки оставляют в холодильнике при температуре +4 °С на 1 сутки, затем помещают в морозильную камеру и в дальнейшем хранят при температуре – 28 °С.

20 Для выделения РНК из образцов пробирки размораживали при комнатной температуре, затем центрифугировали на 12000 об. в течение 5 – 10 минут, надосадочную жидкость удаляли. Полученный осадок представлял собой взвесь эпителиальных клеток, которые были пригодны для выделения РНК.

25 После размораживания проб экстракцию РНК проводили методом фенол-хлороформной экстракции с использованием реагента Тризол (“Invitrogen”, США) согласно инструкции производителя.

30 Качество РНК проверяли методом электрофореза в течение 15 минут при напряжении 10V/см. по интенсивности свечения полос рибосомальной РНК в 1,1 % агарозном геле с бромистым этидием. Затем образцы обрабатывали ДНКазой DNase I RNase free (“Fermentas”, США) согласно инструкции производителя для удаления геномной ДНК.

35 Для проведения обратной транскрипции использовали обратную транскриптазу Mint (“Евроген”, Россия). Для инициации реакции использовали олигодезоксинуклеотиды (oligoDT), синтезированные фирмой «Евроген». В реакцию вносили 500 нг. РНК, предварительно прогретой до 55 градусов (концентрацию мРНК проверяли на спектрофотометре Nanodrop (“ThermoScientific”, США) и 4 мкл. oligoDT (20 мкМ), обратную транскрипцию проводили согласно инструкции производителя.

Качество полученной кДНК оценивали с помощью гель-электрофореза в 1,1% агарозном геле с бромистым этидием. Для дальнейшей ПЦР использовали разведение полученной кДНК со стерильной водой в объеме 2 к 50.

40 Для количественной ПЦР подбор праймеров генов осуществлялся с помощью базы данных BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov). Все полученные пары праймеров были протестированы на возможность образования «шпилек» и димеров с помощью программы Beacon Designer Free Edition (<http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1>). Кроме того, с целью тестирования на димеры праймеров в программу для ПЦР был добавлен этап анализа кривой плавления (melt curve). Праймеры для количественной ПЦР представлены в табл. 1. В качестве генов-нормировщиков использовали бета-актин (beta-actin) и пептидилпролил изомеразу А (PPIA).

Таблица 1.
 Праймеры для количественной ПЦР

Ген	Прямой <u>праймер</u> 5'-3'	Обратный <u>праймер</u> 5'-3'	Т отжи га, °С
TLR2	ATCCTGCTCACGGGGGTCTG	TGCTGGGAGCTTTCCTGGGC	57
TLR10	AGTGCAAGCCGTGGGGGTTT	GTGGCTGGGGTCAAGTCTGCG	60
IDO	TGCTAAACATCTGCCTGATC	GGAGCAATTGACTCAAATCA	61
β-актин	CAGGCACCAGGGCGTGATGG	GATGGAGGGGCCGGACTCGT	64
PPIA	CCGCCGAGGAAAACCGTGACT	TGGACAAGATGCCAGGACCCGT	64

Для ПЦР в режиме реального времени использовали смесь qPCRmix-HS SYBR с интеркалирующим красителем SYBR, в который входит высокопроцессивная Taq-полимераза с горячим стартом, смесь нуклеотидтрифосфатов, магний и буферный раствор.

Для приготовления смеси на одну пробирку вносили 2 мкл кДНК, по 2 мкл прямого и обратного праймера, 5 мкл смеси qPCRmix-HS SYBR, 14 мкл стерильной воды.

Аmplification проводили на амплификаторе CFX96 («Biorad», США).

Режим амплификации:

1. Предварительная денатурация - 1 цикл 95 °С 5 мин.;

2. Денатурация – 1 цикл 95 °С 30 сек.;

3. Отжиг при соответствующей каждому праймеру температуре (см. таблицу) – 30 сек.;

4. Элонгация при 68 °С – 30 сек.

Количество циклов – 45.

Дополнительным этапом после амплификации была добавлена кривая плавления (melt curve) от 55 до 95 градусов по 6 секунд с целью детекции возможных димеров праймеров.

Полученные результаты выражали в относительных единицах (relative units), вычисляя их по формуле

$$R = 2^{-(Cq_{target} - (Cq_{ref1} + Cq_{ref2})/2)}$$

где R – нормализованная экспрессия мРНК исследованных генов, Cq_{ref1} и Cq_{ref2} – Cq генов-нормировщиков, Cq_{target} – Cq исследованного гена конкретной женщины.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы «Statistica 13.2».

Для создания индивидуального прогноза неразвивающейся беременности на основании экспрессии мРНК TLR2, TLR10, IDO в эпителии цервикального канала и оценки возраста менархе использовали метод дискриминантного анализа (табл. 2).

Таблица 2

Информативные признаки и их коэффициенты дискриминантного сравнительного анализа при неразвивающейся и прогрессирующей беременности раннего срока для TLR2, TLR10, IDO и возраста менархе, N=107, F (4,21)=4,2964, p<0,01.

Признак N=107	F-критерий	p-уровень	Коэффициенты признака	
			Неразвивающаяся Беременность	Прогрессирующая беременность
TLR2	7,857291	0,0107	-1058,06	80,7501
TLR10	1,328109	0,2621	56,10	24,1316
IDO	1,939458	0,1783	0,01	0,0080
Возраст <u>менархе</u>	4,191269	0,0533	5,80	5,1076
Constant			40,13	-32,0163

Для того, чтобы отнести пациентку в группу высокого или низкого риска развития неразвивающейся беременности, следует решить два уравнения. В таблице 2 приведены коэффициенты признаков, которые необходимы для подстановки их в 2 дискриминантных уравнения, которые имеют вид:

Для неразвивающейся беременности:

$$y_1 = 40,13 + (-1058,06 * x_1) + 56,10 * x_2 + 0,01 * x_3 + 5,8 * x_4$$

Для прогрессирующей беременности:

$$y_2 = -32,0163 + 80,7501 * x_1 + 24,1316 * x_2 + 0,0080 * x_3 + 5,1076 * x_4,$$

где x_1 – уровень экспрессии мРНК TLR2 (отн.ед.), x_2 - уровень экспрессии мРНК TLR10 (отн.ед.), x_3 - уровень экспрессии мРНК IDO (отн.ед.), x_4 – возраст менархе.

Если y_1 больше y_2 , пациентку следует отнести в группу высокого риска по развитию неразвивающейся беременности. Если y_1 меньше y_2 , то прогнозируется нормальное течение беременности.

Было обследовано 50 пациенток с неразвивающейся беременностью на сроке 6-10 недель и 57 пациенток с прогрессирующей беременностью того же срока. Методом количественной ПЦР определяли экспрессию мРНК TLR2, TLR10, IDO в эпителии цервикального канала, возраст менархе устанавливали методом опроса.

В таблице 3 приведена матрица классификации анализа, из которой видно, что 86,54% женщин с неразвивающейся беременностью были правильно классифицированы, а в группе с прогрессирующей беременностью – 87,72%. Качество распознавания в данной модели составило 88,79%. Достоверность модели была высокой (F=4,2964, p<0,01).

Таблица 3
Матрица классификации дискриминантного анализа

Группа	Верно классифицировано, %	Неразвивающаяся беременность, чел.	Прогрессирующая беременность, чел.
Неразвивающаяся Беременность	86,54	45	7
Нет развивающейся беременности	87,72	5	50
Всего	88,79%	50	57

Таким образом, предложенное изобретение позволяет эффективно прогнозировать неразвивающуюся беременность в 88,79% случаев. Применение данного способа позволит своевременно реализовывать необходимые лечебно-профилактические мероприятия по предупреждению невынашивания беременности.

(57) Формула изобретения

Способ прогнозирования неразвивающейся беременности, включающий выделение РНК из эпителиальных клеток цервикального канала на сроке 6-10 недель беременности, проведение обратной транскрипции с получением кДНК, определение экспрессии TLR2, TLR10 и IDO с помощью количественной полимеразной цепной реакции, оценку возраста начала менархе и прогноз вероятности развития неразвивающейся беременности на основании уравнений, полученных по результатам дискриминантного анализа:

- для неразвивающейся беременности:

$$y_1 = 40,13 + (-1058,06 * x_1) + 56,10 * x_2 + 0,01 * x_3 + 5,8 * x_4;$$

- для прогрессирующей беременности:

$$y_2 = -32,0163 + 80,7501 * x_1 + 24,1316 * x_2 + 0,0080 * x_3 + 5,1076 * x_4,$$

где x_1 – уровень экспрессии мРНК TLR2 (отн.ед.), x_2 – уровень экспрессии мРНК TLR10 (отн.ед.), x_3 – уровень экспрессии мРНК IDO (отн.ед.), x_4 – возраст менархе, при этом, если y_1 больше y_2 , прогнозируют высокий риск развития неразвивающейся беременности, и если y_1 меньше y_2 , то прогнозируют нормальное течение беременности.