

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ

(19) BY (11) 12750

(13) C1

(46) 2009.12.30

(51) МПК (2006)

G 01N 33/50



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(54) СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ВЕРОЯТНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ У ПЛОДА ВРОЖДЕННОГО ПОРОКА РАЗВИТИЯ

(21) Номер заявки: а 20080192

(22) 2008.02.21

(43) 2009.10.30

(71) Заявитель: Учреждение образования
"Гродненский государственный ме-
дицинский университет" (BY)

(72) Авторы: Плоцкий Андрей Романо-
вич; Егорова Татьяна Юрьевна; Нау-
мов Александр Васильевич; Доро-
шенко Евгений Михайлович (BY)

(73) Патентообладатель: Учреждение обра-
зования "Гродненский государствен-
ный медицинский университет" (BY)

(56) RU 2308034 C1, 2007.

RU 2269297 C1, 2006.

RU 2063633 C1, 1996.

RU 2105978 C1, 1998.

HYÁNEK J. et al. Ceska Gynekol., 2000,
v. 65, № 6, p. 406-412.

(57)

Способ прогнозирования вероятности формирования у плода врожденного порока раз-
вития, представляющего собой расщелину верхней губы и твердого неба, порок передней
брюшной стенки или шейную гигрому, отличающийся тем, что в околоплодных водах
беременной женщины определяют методом высокоэффективной жидкостной хроматогра-
фии с флуоресцентной детекцией уровень общего гомоцистеина и при его значении менее
2,5 мкмоль/л прогнозируют вероятность формирования у плода врожденного порока.

Изобретение относится к области медицины, а именно к акушерству, гинекологии и
пренатальной диагностике, и может использоваться для прогнозирования вероятности
формирования у плода врожденного порока развития.

Проведя патентный поиск, нами не выявлено близкого к предлагаемому способу про-
гнозирования вероятности формирования у плода врожденного порока развития.

Задача изобретения - обеспечение возможности прогнозирования вероятности форми-
рования врожденного порока развития у плода в целях проведения качественной и свое-
временной диагностики.

Указанная задача решается путем определения уровня общего гомоцистеина в околоплодных водах беременных женщин методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC - high-performance liquid chromatography) с флуоресцентной детекцией. При уровне общего гомоцистеина в околоплодных водах менее 2,5 мкмоль/л прогнозируют высокую вероятность формирования у плода врожденного порока развития, представляющего собой расщелину верхней губы и твердого неба, порок передней брюшной стенки (омфалоцеле, гастроэзофагеальный синдром) или шейную гигрому.

Способ осуществляют следующим образом.

Околоплодные воды могут быть получены при трансабдоминальном амниоцентезе. Околоплодные воды в количестве 1 мл отбирают автоматической пипеткой, помещают в пробирку, замораживают при температуре - 18 °C. В дальнейшем образцы околоплодных

ВУ 12750 С1 2009.12.30

вод хранят при температуре - 78 °С до момента проведения анализа. Уровень общего гомоцистеина в околоплодных водах определяют методом высокоеффективной жидкостной хроматографии (HPLC - high-performance liquid chromatography) с флуоресцентной детекцией с использованием высокореагентного восстановителя TRIS фосфина и флуоресцентного маркёра SBD-F (ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonate) фирмы "Fluca" (Германия) на аппарате "Agilent 1100".

В день проведения анализа образцы замороженных околоплодных вод размораживали при комнатной температуре. 50 мкл околоплодных вод смешивали с 5 мкл раствора TCEP (tris(2-carboxylethyl)phosphine) (100 мг/мл), после чего оставляли при комнатной температуре на 30 минут. Затем осаждали белки добавлением 50 мкл 10 % раствора ТХУ (трихлоруксусная кислота) и центрифугировали при 4 °С в течение 15 мин при 16000 g. В микропробирку объемом 200 мкл, содержащую 2 мкл 1,55 M NaOH, 12,5 мкл 0,125 M Наборного буфера с 200 мг/л ЭДТА, pH 9,5 и 5 мкл раствора SBD-F (ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonate) (1 мг/мл) в аналогичном буфере, вносили 10 мкл супернатанта и инкубировали 1 час при 60 °С. После охлаждения при комнатной температуре в систему вводили 10 мкл реакционной смеси [Gilfix B.M., Blank D.W., Rosenblatt D.S. Novel reductant for determination of total plasma homocysteine / Clin. Chem. - 1997. - Vol. 43(4). - P. 687-688].

Разделение осуществляли на колонке Diasorb 130 C₁₆T, 3×250 мм, 7 мкм. Подвижная фаза: 0,1 M NaH₂PO₄, 17 mM CH₃COOH, pH 3,65, 40 мг/л ЭДТА, 3 % ацетонитрила. Скорость потока 0,6 мл/мин, температура колонки 30 °С. Детектирование осуществлялось по флуоресценции, 379/510 нм. Определения проводили на хроматографической системе Agilent 1100, содержащей 4-канальный градиентный насос, термостат колонок, автосampler и детектор флуоресценции. Регистрация хроматограмм и их количественная обработка осуществлялись с помощью Agilent ChemStation A10.01.

При уровне общего гомоцистеина в околоплодных водах менее 2,5 мкмоль/л прогнозируют высокую вероятность формирования у плода врожденного порока развития, представляющего собой расщелину верхней губы и твердого неба, порок передней брюшной стенки или шейную гигрому.

Полученные результаты обработаны с помощью методов непараметрической статистики с использованием стандартных компьютерных программ "STATISTICA 6.0", "Microsoft Excel". Рассчитывались медиана, 25 и 75 процентили (Me, 25 %, 75 %). Сравнение групп осуществляли с помощью критерия Манна-Уитни. При помощи метода четырехпольных таблиц рассчитывались основные операционные характеристики теста определения уровня общего гомоцистеина в околоплодных водах: чувствительность, специфичность, прогностическая ценность положительного результата.

Для доказательства заявляемого способа проведено исследование уровня гомоцистеина в околоплодных водах у 36 пациенток, которые были разделены на 2 группы. Основную группу составили 18 пациенток, у которых имелись различные виды врожденных пороков развития плода, подтвержденные при патологоанатомическом исследовании abortusov. Группу сравнения составили 18 пациенток, у которых беременность была прервана по немедицинским показаниям, и при проведении патологоанатомического исследования врожденных пороков развития плода выявлено не было. Околоплодные воды были получены у всех пациенток при проведении трансцервикального амниоцентеза под ультразвуковым контролем. Уровень общего гомоцистеина в околоплодных водах у пациенток основной группы и группы сравнения представлены в таблице.

**Значения уровня общего гомоцистеина (мкмоль/л) в околоплодных водах
у пациенток основной группы и группы сравнения**

Исследуемые группы	Гомоцистеин Ме (25 % - 75 %)	P
Расщелины верхней губы и твердого неба (n = 6)	2,18(1,93-2,33)	p<0,05
Пороки развития передней брюшной стенки (n = 8)	2,27(1,83-2,86)	p<0,05
Шейная гигрома (n = 4)	1,97(1,96-2,04)	p<0,01
Всего (n = 18)	2,04(1,39-2,50)	p<0,001
Группа сравнения (n = 18)	3,74(2,87-6,93)	-

При уровне общего гомоцистеина в околоплодных водах менее 2,5 мкмоль/л диагностическая чувствительность теста составляет 71,4 %, диагностическая специфичность - 83,3 %, прогностическая ценность положительного результата теста - 76,96 %.

Таким образом, заявляемый способ прогнозирования вероятности формирования у плода врожденного порока развития позволяет сформировать группы риска среди беременных женщин для проведения дополнительных диагностических мероприятий с целью подтверждения или исключения некоторых видов врожденных пороков развития плода.

Данный способ может быть применен в работе медико-генетических консультаций и перинатальных центров для прогнозирования высокой вероятности формирования врожденных пороков развития плода и в качестве дополнительного диагностического критерия для выявления расщелин верхней губы и твердого неба, пороков передней брюшной стенки и шейной гигромы у плода.