



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **111305** (13) **U**
(51) МПК (2016.01)
G01N 33/531 (2006.01)
A61B 10/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2016 03771</p> <p>(22) Дата подання заявки: 08.04.2016</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.11.2016</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.11.2016, Бюл.№ 21</p>	<p>(72) Винахідник(и): Коваль Галина Данилівна (UA), Чоп'як Валентина Володимирівна (UA), Юзько Олександр Михайлович (UA), Камишний Олександр Михайлович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД УКРАЇНИ "БУКОВИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ" МОЗ УКРАЇНИ, пл. Театральна, 2, м. Чернівці, 58002 (UA)</p>
--	---

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ЕНДОМЕТРІОЗУ ЗА ВИЗНАЧЕННЯМ ТРАНСКРИПЦІЙНИХ ФАКТОРІВ РЕГУЛЯЦІЇ ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ ІМУННИХ КЛІТИН В ТКАНІНІ ЕНДОМЕТРІЯ

(57) Реферат:

Спосіб діагностики ендометріозу за визначенням транскрипційних факторів регуляції диференціювання імунних клітин в тканині ендометрія включає діагностику ендометріозу. Додатково визначають експресію мРНК транскрипційних факторів регуляції диференціювання Т-хелперів 1-го і 2-го типів в тканині ендометрія: T-bet, GATA-3 та їх співвідношення, відповідно, методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі.

UA 111305 U

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме до гінекології та клінічної імунології, і може бути використана для підвищення точності діагностики ендометріозу у жінок з безпліддям.

5 Ендометріоз - це дисгормональне, імунозалежне захворювання з генетичною схильністю, яке характеризується доброякісним розростанням тканини за морфологічними ознаками, схожою на ендометрій, поза межами матки (Айламазян Э.К. Генитальный эндометриоз / Айламазян Э.К., Потин В.В., Тарасова М.А // Гинекология от пубертата до постменопаузы. М.: Медпресс-информ. - 2007. - №1. - С. 284-302; Марченко Л.А. Современный взгляд на отдельные аспекты патогенеза эндометриоза (обзор литературы) / Л.А. Марченко, Л.М. Ильина // Проблемы репродукции (сборник статей по эндометриозу). - 2011. - №1. - С. 20-25). Згідно Наказу МОЗ України від 15.12.2003 р. №582 "Про затвердження клінічних протоколів з акушерської та гінекологічної допомоги", генітальний ендометріоз - це доброякісне гормонально залежне захворювання, в основі якого лежить гетеротопія ендометрія на тлі порушення функції гіпоталамо-гіпофізарно-яєчникової системи, імунного дисбалансу при наявності генетичної схильності.

15 Ендометріоз належить до найпоширеніших гінекологічних захворювань та вражає за різними даними до 15 % жінок репродуктивного віку. За даними різних авторів, ендометріоз зустрічається у 25-50 % жінок з безпліддям (Адамян Л.В., Кулаков В.И., Андреева Е.Н. Эндометриозы. Руководство для врачей. М.: Медицина, 2006, Баскаков В.П., Цвелев Ю.В., Кира Е.Ф. Эндометриоидная болезнь. СПб.: Изд-во Н-Л, 2002). Окрім того, ендометріоз виявляється у 25-47 % дівчаток підліткового віку, яких оперували з приводу тазового болю (McLeod B.S. Epidemiology of endometriosis: an assessment of risk factors / B.S. McLeod, M.G. Retzliff // Clin. Obstet. Gynecol. - 2010. - Vol. 53. - P. 39-396; Laparoscopic evaluation and management of chronic pelvic pain during adolescence / Kontoravdis A., Hassan E., Hassiakos D. [et al.] // Clin. Exp. Obstet. Gynecol. 1999. - Vol.26. - P. 76-77.). Найважливішу роль ендометріоз відіграє у розвитку безпліддя - генітальний ендометріоз асоційований з безпліддям у 25-50 % пацієнтів, а перитонеальна форма супроводжується безпліддям у 60-80 % випадків (Савицкий Г.А. Перитонеальный эндометриоз и бесплодие (клинико-морфологические исследования) / Г.А. Савицкий, С.М. Горбушин. - СПб.: ЭЛБИС СПб. - 2002. -170 с.; Giudice LC, Kao LC: Endometriosis. Lancet 2004, 364:1789-1799). Ендометріоз супроводжується такими явищами, як больовий синдром (альгодисменорея, біль внизу живота, не пов'язаний із менструальним циклом, диспареунія); безпліддя (первинне, вторинне); геморагічний синдром (передменструальні кровомазання, метрорагія, гіперполіменорея, порушення менструального циклу); тривале неефективне лікування хронічних аднекситів, метритів; психоневрологічні розлади; порушення функції суміжних органів (дизурія, болючість при дефекації), що, безумовно, становить серйозну медико-соціальну проблему.

40 Етіологія і патогенез ендометріозу до кінця залишаються невивченими, зокрема, розглядаються такі теорії виникнення ендометріозу як імплантаційна, гормональна, імунна, дизонтогенетична, метапластична, неопластична, генетична. В останні роки все більше уваги приділяють імунній теорії виникнення ендометріозу, ролі імунних клітин та цитокінів, та, особливо, типу імунної відповіді за ендометріозу [Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component / S. Podgaec, M.S. Abrao, J.A. Jr Dias [et al.] // Hum Reprod. - 2007. - № 22. - Vol. 5. - P. 37-39].

45 Відповідно до клінічних протоколів діагностики зовнішнього генітального ендометріозу використовуються наступні методи: 1) бімануальне дослідження (С) у деяких випадках дозволяє виявити збільшення, тяжистість, нерухливість, фіксація у позаматковому просторі додатків; обмеження в рухливості органів малого тазу; болючість при пальпації; 2) ультразвукове дослідження абдомінальним, вагінальним, ректальним датчиком (А) дозволяє виявити збільшення додатків, їх неоднорідну акустичну щільність, фіксацію у задньому склепінні; наявність утворення круглявої форми із чіткою капсулою, слабо ехогенною внутрішньою структурою (зависсю) (ендометріюїдна киста); ознаки перифокального спайкового процесу; 3) комп'ютерна томографія, магнітно-резонансна томографія (А, С) дозволяє виявити утворення круглявої форми із достатньо щільною капсулою (ендометріюїдна киста); зрощення із іншими структурами; 4) лапароскопія є "золотим стандартом" діагностики ендометріозу (А) та дозволяє візуалізувати сині, багряні, кистозні, крапчасті або вузликові структури, біляві або сіруваті вузлики; наявність рубцевих змін, спайкового процесу; синюваті кистозні структури - ендометріюїдні кисти; 5) цитологічне та гістологічне дослідження матеріалу із порожнини матки та шийки матки малоінформативне, достовірна гістологія біопсійного матеріалу, матеріалу гістерорезекції та післяопераційних препаратів(С); 6) лабораторні методи (А, С) - визначення онкомаркерів (СА-125).

Відомий спосіб діагностики ендометріозу, який включає 3 етапи: на I етапі - (скринінговому) оцінюються скарги та дані анамнезу, проводяться об'єктивне дослідження, кольпоскопія, бімануальне та ректовагінальне дослідження, бактеріологічне дослідження виділень з уретри, піхви та цервікального каналу, цитологічне дослідження; II етап включає УЗД органів малого тазу, гормональне обстеження, визначення онкомаркерів, гістоскопію, цистоскопію, ректороманоскопію, рентгеноскопію поперекового відділу хребта, комп'ютерну та ядерну магнітно-резонансну томографію; III етап складається з діагностичної та лікувальної лапароскопії з наступним гістологічним дослідженням препаратів (Запорожан В.М., Цегельський М.Р. Гінекологічна патологія: Атлас: Навч. посібник. - Одеса: Одес. держ. мед. ун-т, 2002. - 30 с.). Таким чином, серед стандартних методів діагностики ендометріозу повністю достовірним може бути лише лапароскопія, яка являє собою інвазивну методику, в той час, як неінвазивні методи низькочутливі, а малоінвазивні лабораторні маркери малочутливі та їх недостатньо. Особливо, це стосується перитонеальних форм ендометріозу, які належать до найпоширеніших, однак не виявляються інструментальними методами. Тому доповнення існуючих методів діагностики ендометріозу малоінвазивними лабораторними методами є вкрай необхідним, особливо, для визначення динаміки ефективності лікування перитонеального ендометріозу, діагностованого лапароскопічним методом, задля запобігання повторній лапароскопії.

Найближчим аналогом корисної моделі є спосіб прогнозування прогресування зовнішнього генітального ендометріозу (Пат. № 67552, України, Спосіб прогнозування прогресування зовнішнього генітального ендометріозу / Самойлова М.В., Бенюк В.О., Танько О.П., Винярський Я.М.; Заявник: Харківський національний медичний університет, заявл. № u201109578 від 01.08.2011, опублік. 27.02.2012, бюл. №4), в якому при збереженні основних принципів діагностики ендометріозу в жінок додатково аналізують рівень внутрішньоклітинного синтезу регуляторного цитокіну IL-4 у загальній популяції лімфоцитів та фенотипу CD4+IL-4 у популяції Т-хелперів периферійної крові.

Недоліком найближчого аналога є те, що визначення синтезу IL-4 у загальній популяції лімфоцитів та фенотипу CD4+IL-4 у популяції Т-хелперів периферійної крові відображає лише системні показники у популяції лімфоцитів периферичної крові без локального аналізу і лише з визначенням одного фенотипу Т-хелперів за синтезом одного цитокіну.

В основу корисної моделі поставлено задача удосконалити спосіб діагностики ендометріозу шляхом визначення рівнів експресії мРНК транскрипційних факторів регуляції диференціювання Т-хелперів 1-го і 2-го типів в тканині ендометрія: T-bet, GATA-3 та їх відношення, відповідно, методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі діагностики ендометріозу за визначенням транскрипційних факторів регуляції диференціювання імунних клітин в тканині ендометрія, що включає діагностику ендометріозу та додаткове визначення імунних показників, згідно з корисною моделлю, додатково визначають експресію мРНК транскрипційних факторів регуляції диференціювання Т-хелперів 1-го і 2-го типів в тканині ендометрія: T-bet, GATA-3 та їх співвідношення, відповідно, методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі; і при підвищеному рівні T-bet (більше 3,15 кДНК), GATA-3 (більше 3,00 кДНК) та зниженні співвідношення T-bet/GATA-3 (менше 4,00) діагностують ендометріоз

Спільними ознаками найближчого аналога та корисної моделі є основні принципи діагностики ендометріозу в жінок та додаткове визначення імунних показників.

Відмінності корисної моделі від найближчого аналога представлені в наступній таблиці.

Таблиця

Порівняння корисної моделі та прототипу за ознаками

Ознаки	Корисна модель	Прототип
Визнання фенотипу Т-хелперів	в тканині ендометрію	в культурі клітин
Визначення рівнів	T-bet, GATA-3, T-bet/GATA-3	IL-4

Визначення термінів, які використовуються при описі корисної моделі: ендометріоз, безпліддя, імунні клітини, Т-хелпери, цитокіни фактори транскрипції регуляції диференціювання імунних клітин, T-bet, GATA-3, Tbet/GATA-3, полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі.

Теоретичні передумови здійснення способу.

Загальноновизнано, що розвиток такого захворювання, як ендометріоз відбувається на тлі імунологічного дисбалансу. Доказами цього твердження є результати багатьох наукових робіт,

котрі демонструють суттєві зміни на рівні вроджених та набутих імунологічних механізмів. Не викликає сумніву й роль порушень імунологічної регуляції у формуванні безпліддя, асоційованого з ендометріозом. Однак, глибина та патологічна вісь порушень імунологічних взаємозв'язків при ендометріозі достеменно не з'ясовані - більшість наукових робіт констатують

5 факти тих чи інших змін на рівні локального чи системного імунітету, без в'яснення природи цих порушень та типу імунної відповіді при ендометріозі. На нашу думку, визначальними факторами розвитку імунної відповіді при ендометріозі, у тому чи іншому напрямку, є імуногенетичні, молекулярні фактори. Зокрема, важливим і невирішеним питанням патогенезу ендометріозу є порушення парадигми Th1/Th2 клітин. Доказами порушень співвідношення Th1/Th2 клітин є

10 дуже багато робіт, які демонструють порушення балансу цитокінів Th1/Th2 у хворих з ендометріозом [Changes in the T-helper cytokine profile and in lymphocyte activation at the systemic and local levels in women with endometriosis / Y.S. Antsiferova, N.Y. Sotnikova, L.V. Posiseeva [et al.] // Fertility and sterility. - 2005. - Vol. 84. - P. 1705-1711]. Зокрема, встановлено, що при ендометріозі в перитонеальній рідині зростає кількість типових Th1 цитокінів - INF- γ та IL-2 та

15 типового Th2 цитокіну - IL-4 [Interleukin-4 Stimulates Proliferation of Endometriotic Stromal Cells / Z.O. Yang, Y. Hirota, Y. Osuga [et al.] // Am J Pathol. - 2008. - Vol. 173, № 2. - P. 463-469; Interleukin-6 and tumor necrosis factor α -mediated expression of hepatocyte growth factor by stromal cells and its involvement in the growth of endometriosis / K.N. Khan, H. Masuzaki, A. Fujishita [et al.] // Hum Reprod. - 2005. - № 20. - P. 2715-2723]. Однак, чи є ендометріоз Th1- чи Th2-опосередкованим захворюванням достеменно не зрозуміло, адже типові Th1- чи Th2 цитокіни, також, можуть продукуватися іншими типами клітин і на сучасному етапі така оцінка здійснюється шляхом визначення відповідних транскрипційних факторів регуляції диференціювання імунних клітин. Було показано, що вивчення транскрипційних факторів регуляції диференціювання Th1 та Th2 (T-bet та GATA-3 відповідно) та їх співвідношення, тобто

20 T-bet /GATA-3 більш об'єктивно відображають Th1/Th2 диференціацію, ніж лише визначення рівнів відповідних цитокінів, як це було прийнято [Coomes S.M. Plasticity within the $\alpha\beta^+$ CD4 $^+$ T-cell lineage: when, how and what for? [Електронний ресурс] / S. M. Coomes, V. S. Pelly and M. S. Wilson //Open Biology/ - 2013. -№ 3. - P.3-12]. І, власне, вираження цих транскрипційних факторів має великий вплив на загальний характер імунної відповіді та синтезу цитокінів, зокрема.

30 Однак, відомостей про експресію генів T-bet та GATA-3 в ендометрії жінок з ендометріозом, асоційованим з безпліддям, практично немає, що не відкриває дане питання. Тому, було висловлено припущення, що запальний процес при ендометріозі, асоційованому з безпліддям, зумовлений імуногенетичною дисрегуляцією. При подальших дослідженнях, результати наших досліджень показали, що в тканині ендометрію у жінок з ендометріозом спостерігається

35 зростання експресії T-bet та GATA-3, що супроводжується зниженням співвідношення T-bet/GATA-3.

Спосіб здійснюється наступним чином.

При збереженні основних принципів діагностики ендометріозу в жінок додатково визначають експресію мРНК транскрипційних факторів регуляції диференціювання Т-хелперів 1-го і 2-го

40 типів в тканині ендометрія: T-bet та GATA-3 та їх відношення, відповідно, методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. При підвищеному рівні T-bet (більше 3,15 кДНК), GATA-3 (більше 3,00 кДНК) та зниженні співвідношення T-bet/GATA-3 (менше 4,00) діагностують ендометріоз.

Технічний результат. Запропонований спосіб дозволяє проводити ефективну діагностику ендометріозу шляхом визначення рівнів експресії T-bet, GATA-3 та співвідношення T-bet/GATA-

45 3.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

50 Спосіб діагностики ендометріозу за визначенням транскрипційних факторів регуляції диференціювання імунних клітин в тканині ендометрія, що включає діагностику ендометріозу та додаткове визначення імунних показників, який **відрізняється** тим, що додатково визначають експресію мРНК транскрипційних факторів регуляції диференціювання Т-хелперів 1-го і 2-го

55 типів в тканині ендометрія: T-bet, GATA-3 та їх співвідношення, відповідно, методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі; і при підвищеному рівні T-bet (більше 3,15 кДНК), GATA-3 (більше 3,00 кДНК) та зниженні співвідношення T-bet/GATA-3 (менше 4,00) діагностують ендометріоз.

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

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