

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038901**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.11.03

(21) Номер заявки
201900457

(22) Дата подачи заявки
2019.09.27

(51) Int. Cl. **G01N 33/86** (2006.01)
A61B 5/145 (2006.01)

(54) СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ТРОМБОЭМБОЛИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ У ЖЕНЩИН ПРИ НОСИТЕЛЬСТВЕ МУТАЦИЙ ГЕНА ПРОТРОМБИНА [F2(20210)GA]

(43) **2021.03.31**

(96) **2019000110 (RU) 2019.09.27**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
"НАЦИОНАЛЬНЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ГЕМАТОЛОГИИ" МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБУ "НМИЦ ГЕМАТОЛОГИИ"
МИНЗДРАВА РОССИИ) (RU)**

(56) ADETOLA F. LOIS-JACQUES et al.
Prenatal Screening for Thrombophilias: Indications
and Controversies, an Update//Clin Lab Med, 2016
Jun; 36(2): 421-34, реферат, раздел "Prothrombin
Gene (G20210A)", табл. 2

WO-A2-2012171949

Г.В. БАВИЛОВА. Лабораторные
исследования системы гемостаза и поиск
причин тромбоэмболических осложнений//
Новости хирургии, с. 145-155, реферат, с. 148
правая колонка 7 абзац; с. 149 левая колонка
3 абзац; с. 149 раздел "Протромбиновое
время"; с. 154 раздел "Молекулярно-генетические
исследования"

RU-C1-2652894

UA-A-67672

(72) Изобретатель:
**Николаева Мария Геннадьевна,
Момот Андрей Павлович, Ясафова
Наталья Николаевна, Момот Ксения
Андреевна, Тараненко Ирина
Алексеевна, Зайнулина Марина
Сабириева (RU)**

(57) Изобретение относится к медицине, в частности к лабораторной диагностике, и может быть использовано для прогнозирования тромбоэмболических осложнений у женщин, носительниц мутации гена протромбина [F2(20210)GA] по определению активности фактора протромбина для формирования групп риска, нуждающихся в проведении антикоагулянтной профилактики. Описан способ прогнозирования развития тромбоэмболических осложнений у женщин при носительстве мутации гена протромбина [F2(20210)GA], отличающийся тем, что определяют активность протромбина и при его значении 174,8% и выше прогнозируют риск развития ВТЭО. Заявляемый способ обладает высокой точностью, является высокоинформативным и позволяет формировать группу риска по развитию тромбозов до появления первых клинических симптомов и назначить персонализированную медикаментозную профилактику для уменьшения риска развития тромбоэмболии легочной артерии и связанной с ней инвалидизацией и летальностью.

B1**038901****038901****B1**

Изобретение относится к медицине, в частности к лабораторной диагностике, и может быть использовано для прогнозирования венозных тромбоэмболических осложнений (ВТЭО) у женщин, носительниц мутации гена протромбина [F2(20210)GA], по определению активности протромбина для формирования группы риска, нуждающихся в проведении антикоагулянтной профилактики.

Венозные тромбоэмболические осложнения остаются одной из важных проблем клинической медицины. Несмотря на значительные достижения в области клинической практики и фармакологии эти заболевания по-прежнему остаются ведущей причиной смертности и инвалидизации населения в развитых странах и представляют глобальную медико-социальную проблему.

Мутация гена протромбина [F2(20210)GA] встречается у 2-5% населения, увеличивая риск развития венозного тромбоза в 3-4 раза. Однако в настоящее время нет точных и объективных лабораторных критериев для отбора женщин с мутацией гена протромбина [F2(20210)GA] в группу риска развития ВТЭО, нуждающихся в персонифицированной гепаринопрофилактике для предупреждения тромбозов.

Известен способ прогнозирования возникновения венозного тромбоза и тромбоэмболии легочной артерии (Патент Казахстана № 17498, 14.07.2006). Сущность изобретения состоит в том, при исследовании крови выделяют ДНК, проводят анализ полиморфизма длины рестрикции фрагментов ДНК и при выявлении мутации фактора 5 Лейден в гене F5 и/или мутации фактора F2 в гене протромбина прогнозируют возникновение венозного тромбоза и тромбоэмболии легочной артерии.

Недостатком известного способа является то, что он позволяет выявить лиц с наследственной предрасположенностью к венозным тромбозам, но не обеспечивает прогнозирование развития тромбоза в выделенной когорте.

Известен способ прогнозирования тромбоза в коронарном стенте при чрескожном коронарном вмешательстве у больных ишемической болезнью сердца (Патент РФ № 218.016.7535; 26.07.2018), заключающийся в том, что у больного определяют содержание креатинфосфокиназы (КФК), протромбиновый индекс (ПТИ), активированное время рекальцификации (ABP). Полученные результаты обследования подставляют в математическую модель прогнозирования риска развития тромбоза в коронарном стенте: $p = 1 / (1 + e^{ПТИ * 0,06 - 0,076 * КФК * -0,013 * ABP + 1,5}) \cdot 100$.

Недостатком известного способа является определение прогностического показателя для развития тромбоза у ограниченного круга лиц, страдающих ишемической болезнью сердца с плановым стентированием коронарных сосудов. Данный способ позволяет прогнозировать осложнение уже имеющейся болезни, а не проводить первичную стратификацию пациентов и возможную профилактику.

Известен способ прогнозирования развития тромбоза (Патент СССР № 1634249; 15.03.1991), заключающийся в том, что определяют отношение разницы максимальных амплитуд записанных тромбоэластограмм к разнице между исходным количеством тромбоцитов и количеством тромбоцитов после повторного центрифугирования. При увеличении этого показателя в 1,5 раза по отношению с контролем прогнозируют развитие тромбоза в 71% случаев.

Недостатком известного способа является использование дорогостоящего оборудования, трудоемкость процедуры.

Наиболее близким по достигаемому техническому результату (прототипом) является способ прогнозирования развития тромбоза глубоких вен голени путем определения экспрессии ингибитора активатора плазминогена 1 типа (PAI-1) (Китай; 2018) [Tang J., Zhu W., Mei X., Zhang Z. (2018) Plasminogen activator inhibitor-1: a risk factor for deep vein thrombosis after total hip arthroplasty. J. Orthop. Surg. Res., 13(1):8]. Показано, что при медиане показателя PAI-1 $32,1 \pm 12,5 \text{ ng/ml}$, риск венозного тромбоза увеличивается в 1,18 раза (OR 1,18, 95% DI 1,04-1,29; $p=0,011$).

Недостатком известного способа является его невысокая точность.

Авторы предлагают простой, доступный способ прогнозирования ВТЭО, обладающий высокой точностью у женщин, носительниц мутации гена протромбина [F2(20210)GA]. Способ прогнозирования развития тромбоэмболических осложнений у женщин при носительстве мутации гена протромбина [F2(20210)GA] заключается в том, что определяют активность протромбина, и при его значении 174,8% и выше прогнозируют риск развития ВТЭО.

Данный способ позволяет сформировать группу риска по развитию тромбозов до появления первых клинических симптомов и назначить персонифицированную медикаментозную профилактику для уменьшения риска развития тромбоэмболии легочной артерии и связанной с ней инвалидизацией и летальностью.

Техническим результатом заявляемого способа является повышение точности прогноза развития тромботических событий у женщин, носительниц мутации гена протромбина [F2(20210)GA], на основе установленной авторами активности протромбина с целью принятия решения о проведении антикоагулянтной профилактики.

Технический результат достигается тем, что определяют активность протромбина (фактора II) путем использования дефицитной по субстрату плазмы.

Способ может быть осуществлен, например, следующим образом:

Определяют время свертывания исследуемого образца бедной тромбоцитами плазмы в смеси, со-

держатель дефицитную по фактору II плазму, разведенную исследуемую плазму и реагент "Тромборель S".

Количественное определение активности коагуляционного фактора II выполняют по графику зависимости активности фактора II (в %) от протромбинового времени свертывания.

Оборудование, материалы, реагенты

В соответствии с инструкцией к применяемому набору реагентов использовать автоматический или полуавтоматический коагулометр;

Плазма субстратная с дефицитом фактора II (каталожный номер 5190). Лиофильно высушенная плазма крови человека, уровень фактора II в которой не выше 1%;

Тромборель S (каталожный номер ОУНР49). Лиофильно высушенная тромбопласти - кальциевая смесь из кроличьего мозга;

Физиологический раствор 0,9% NaCl;

Контрольная плазма (пулированная от 25 доноров лиофильно высушенная плазма крови человека с известным содержанием фактора II);

Дистиллированная вода.

Приготовление анализируемых образцов

Кровь для исследования забирают утром, натощак, из локтевой вены в пробирки "VACUETTE" 9 мл, содержащие 3,8% раствор цитрата натрия, соотношение объемов крови и цитрата натрия - 9:1. Кровь центрифугируют при 3000-4000 об/мин (1200 г) в течение 15 мин, в результате получают бедную тромбоцитами плазму, которую переносят в другую пробирку, где хранят до проведения исследования.

Центрифугирование обычно проводится непосредственно после взятия крови, а отбор плазмы на исследование - сразу же после центрифугирования. Не допускается анализ плазмы крови, имеющей сгустки, гемолиз и полученной более 2 ч назад. Перед проведением анализа все исследуемые образцы развести 0,9% физиологическим раствором NaCl в 5 раз (0,1 мл образца + 0,4 мл физиологического раствора).

Приготовление реагентов и проведение анализа

1. Подготовка реагентов к работе

1.1. Разведение дефицитной по фактору II плазмы

Во флакон с дефицитной по фактору II плазмой внести 1,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре (+18 - +25°C) и легком покачивании (избегая образования пены) в течение 3 мин. Разведенную плазму перед исследованием выдержать не менее 25-30 мин при комнатной температуре.

1.2. Приготовление реагента Тромборель S

В один флакон с реагентом Тромборель S внести 2,0 мл дистиллированной воды. Флакон встряхнуть и выдержать при +37°C (на водяной бане) в течение 20 мин. Перед каждым определением разведенный реагент перемешать во избежание выпадения осадка.

1.3. Разведение контрольной плазмы

Во флакон с контрольной плазмой внести 1,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре (+18 - +25°C) в течение 3 мин. Перед использованием контрольная плазма должна быть выдержана при комнатной температуре в течение 15 мин.

1.4. Приготовление разведений для построения калибровочного графика представлено в табл. 1.

Таблица 1. Схема разведений калибровочного образца для построения контрольного графика

Пробирка, №	1	2	3	4
Физиологический раствор 0,9% NaCl, мл	0,9	0,5	1,6	0,9
Контрольная плазма с аттестованным значением активности фактора II (100 %)	0,1 мл	-/-	-/-	-/-
Перемешать и перенести в другую пробирку	▼ 0,5мл	▼ 0,4мл	▼ 0,1мл	▲
Получаемое разведение	1:10	1:20	1:100	1:1000
Активность фактора II	100 %	50 %	10 %	1 %

1.5. Построение калибровочной кривой

Для каждого разведения контрольной плазмы выполнить определения дважды, средний результат отметить на калибровочной кривой. На оси Y отложить время свертывания каждого разведенного образца контрольной плазмы в секундах, на оси X - соответствующее значение активности коагуляционного фактора в процентах, %. Через полученные точки провести калибровочный график, который в биологических координатах должен представлять собой прямую линию в диапазоне активности фактора II от 1 до 100%.

2. Проведение анализа

2.1. Мануальный вариант:

2.1.1. К 0,1 мл разведенной в 5 раз исследуемой плазмы, взятой в пробирку, добавить 0,1 мл разве-

денной дефицитной по фактору II плазмы.

2.1.2. Инкубировать при температуре +37°C в течение 1 мин.

2.1.3. Добавить 0,2 мл разведенного реагента Тромборель S, имеющего температуру +37°C, и включить секундомер. Зарегистрировать время свертывания.

2.1.4. Используя калибровочную кривую, найти активность фактора II. Если время коагуляции исследуемой плазмы соответствует активности фактора II менее 100%, например только 95%, результат, считанный с кривой, умножается на 0,95. В случае времени коагуляции, которое соответствует содержанию фактора коагуляции более 100%, требуются дополнительные определения с использованием более высоких разведений исследуемой плазмы (например, в 10 раз). В этом случае полученный результат в % должен быть умножен на коэффициент, соответствующий разведению; например для разведения в 10 раз результат умножается на 2.

2.2. Коагулометрический вариант:

Исследование плазмы крови проводится на коагулометрах с механическим или оптическим (например, Siemens BCS XP) принципом регистрации результатов.

2.2.1. Выбрать на коагулометре программу для определения активности фактора II одностадийным клоттинговым методом;

2.2.2. Поместить флаконы с приготовленными реагентами в соответствующие ячейки коагулометра;

2.2.3 Запустить программу построения калибровочной прямой (для каждой новой серии реагентов);

2.2.4 Поместить в кювету коагулометра контрольные и исследуемые образцы плазмы;

2.2.5 Запустить программу измерения;

2.2.6 Считать результаты.

Чтение результатов

Активность протромбина (фактора II) выражается в международных единицах (МЕ) или в процентах, причем 1 МЕ/мл соответствует 100% активности. У здоровых пациентов, без носительства мутации гена протромбина, генотип [F2(20210)GG], активность протромбина (фактора II) составляет 70-120% [Fickenscher K. Analysis of individual coagulation factor. In: Thomas L, ed. Clinical Laboratory Diagnostics. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998: 607-9]. Референтные интервалы варьируются и зависят от исследуемой популяции, используемой техники, методов, оборудования и партии реагентов. Апробация заявляемого способа прогнозирования тромботических событий при носительстве мутации гена протромбина [F2(20210)GA].

Апробация заявляемого способа проведена на 140 пациентках, включенных в базу данных "Носители мутации протромбина [F2(G20210A)] на территории России" (Свидетельство № 2018621494 от 19.09.2018) с установленным носительством мутации гена протромбина [F2(20210)GA].

Всем пациенткам проводилось исследование показателя активности протромбина один раз в три месяца. У 32 (22,8% от 140) пациенток при динамическом наблюдении развился эпизод ВТЭО, при этом медиана показателя активности протромбина за две недели до тромбоза составляла 178,2% (95% CI 170,4-204,6%), что достоверно больше ($p < 0,0001$), чем у пациенток без тромботического события - 148,8% (95% CI 145,3-156,9%).

Изобретение иллюстрируется фигурой, на которой изображена ROC-кривая, определяющая критический порог отсечки активности протромбина (%) и построенная при анализе чувствительности и специфичности у пациенток с развитием тромбоза при носительстве мутации гена протромбина [F2(20210)GA]. Площадь под кривой (AUC) у показателя активности протромбина 174,8% составляет 0,904 (95% CI 0,825-0,955) при уровне значимости (p -level) $p < 0,0001$. Чувствительность предиктора - 81,8, специфичность - 91,5.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что заявляемый способ прогнозирования тромбоэмболического осложнения у женщин при носительстве мутации гена протромбина [F2(20210)GA], при активности протромбина 174,8% обеспечивает точность прогноза в 90,4% случаев (табл. 2)

Клинические примеры

1. Пациентка В.Ю.А., 28 лет. Наблюдалась у гематолога в Алтайском филиале ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр гематологии". В анамнезе одни преждевременные роды в 33-34 недели, вторичное бесплодие 2 года. На этапе планирования беременности при обследовании выявлено носительство мутации гена протромбина [F2(20210)GA]. При очередном диспансерном наблюдении определена активность протромбина 198,2%. Через 3 дня после визита к гематологу пациентка заболела ОРВИ средней тяжести с гектической лихорадкой, выраженными симптомами интоксикации. Эпизод тромбоза реализовался на этапе выздоровления (8 сутки от начала заболевания), с локализацией тромба в области глубоких вен голени. Пациентка госпитализирована в отделение сосудистой хирургии.

2. Пациентка Ч.О.Н., 32 года. Наблюдалась в центре сохранения и восстановления репродуктивной функции Алтайской краевой клинической больницы с диагнозом: первичное бесплодие в течение 8 лет. На этапе обследования выявлено носительство мутации гена протромбина [F2(20210)GA], с активностью протромбина 185,7%. В процессе подготовки к проведению протокола вспомогательных репродуктивных технологий выполнено исследование проходимости маточных труб (гистеросальпингография). На вто-

рые сутки после проведения процедуры госпитализирована в отделение сосудистой хирургии с острым тромбозом подвздошно-подколенно-бедренного сегмента. В процессе лечения пациентке был имплантирован кава-фильтр

3. Пациентка Г.И.Г., 34 года. Наблюдалась в городском центре планирования семьи и репродукции на специализированном приеме по невынашиванию беременности. В анамнезе две неразвивающиеся беременности при сроке гестации 7-8 недель. На этапе планирования беременности при обследовании выявлено носительство мутации гена протромбина [F2(20210)GA], с активностью протромбина 187,2%. Без согласования с гематологом с целью регуляции менструального цикла пациентке были назначены эстрогенсодержащие комбинированные контрацептивы. После приема 13 таблетки у пациентки диагностирована тромбоэмболия легочных артерий.

4. Пациентка М.Н.В., 36 года. Наблюдалась в центре сохранения и восстановления репродуктивной функции Алтайской краевой клинической больницы с диагнозом: вторичное бесплодие в течение 5 лет. На этапе планирования беременности при обследовании выявлено носительством мутации гена протромбина [F2(20210)GA], с активностью протромбина 155,4%. Согласно индивидуальному плану ведения пациентке выполнена гинекологическая операция - лапароскопия эндометриоидных кист яичников. Течение послеоперационного периода благоприятное. В качестве профилактики ВТЭО использовались градуированный компрессионный трикотаж.

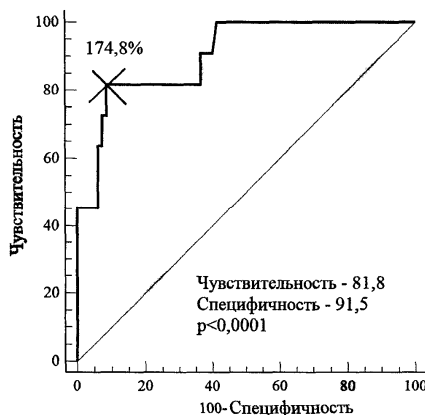
Таким образом, заявляемый способ прогнозирования ВТЭО у женщин при носительстве мутации гена протромбина [F2(20210)GA] по определению активности протромбина обладает высокой точностью, является высокоинформативным и позволяет формировать группу риска по развитию ВТЭО для проведения персонализированной медикаментозной профилактики и терапии для уменьшения риска развития тромбоэмболии легочной артерии

Таблица 2

Показатель	Количество обследованных
Всего женщин	140
истинно положительный результат	32
ложноположительный результат	2
истинно отрицательный результат	103
ложноотрицательный результат	3
Итого:	
точность заявленного способа – 90,4%	
чувствительность заявленного способа – 81,8%	
специфичность заявленного способа – 91,5%	

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ прогнозирования развития тромбоэмболических осложнений у женщин при носительстве мутации гена протромбина [F2(20210)GA], отличающийся тем, что определяют активность протромбина и при его значении 174,8% и выше прогнозируют риск развития венозных тромбоэмболических осложнений (ВТЭО).



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2