Міністерство освіти і науки України

Національний університет «Києво-Могилянська академія»

Факультет природничих наук

Кафедра лабораторної діагностики біологічних систем

Магістерська робота

освітній ступінь – магістр

на тему «**НАТИВНИЙ БІЛОК PAMG-1 ЯК БАЗОВИЙ КОМПОНЕНТ ДІАГНОСТИЧНОЇ ТЕСТ-СИСТЕМИ НА ВИЯВЛЕННЯ ПЕРЕДЧАСНИХ ПОЛОГІВ»**

Виконала: студентка 2-го року навчання

Спеціальність: 091 Біологія

09 Біологія

Савчук Юлія Ігорівна

Керівники:

Будаш Г.В.,

кандидат біологічних наук, старший науковий викладач

Погрібна А.П.,

кандидат біологічних наук

Рецензент Новосильна О.В.

Кваліфікаційну роботу захищено

з оцінкою _____

Секретар ЕК Пахаренко М. В.

«____» червня 20__ року

Київ – 2021

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ 4
ВСТУП 5
РОЗДІЛ 1 7
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 7
1.1 Проблематика передчасних пологів. 7
1.1.1. Причини передчасних пологів. 7
1.1.2. Роль державної медицини у проблемі передчасних пологів. 13
1.2. Діагностика передчасних пологів 15
1.2.1 Біологічні маркери при діагностуванні передчасних пологів 16
1.3. Плацентарний альфа-мікроглобулін-1 (PAMG-1) - білок амніотичної рідини вагітних жінок. 19
1.3.1. PAMG-1 як маркер розриву плідних оболонок та передчасних пологів. 19
РОЗДІЛ 2 21
ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ 21
2.1. ОБ'ЄКТИ ДОСЛІДЖЕННЯ 21
2.2. МАТЕРІАЛИ 21
2.1.1. Реактиви. 21
2.1.2. Обладнання. 21
2.3 МЕТОДИ 22
2.3.1. Очищення PAMG-1 з амніотичної рідини. 22
2.3.2. Гель-фільтраційна хроматографія. 23
2.3.3. Електрофорез отриманих зразків PAMG-1. 24
2.3.3.1. Об'єднання фракцій із найвищим ступенем чистоти та розрахунок концентрації PAMG-1. 25
2.3.4. Імунізація лабораторної тварини (кроля) попередньо отриманою фракцією білка PAMG-1. 25
2.3.4.1. Підготовка антигену (білку PAMG-1) до імунізації. 26

2.3.4.2. Методика проведення ін’єкцій лабораторній тварині. 26
2.3.4.3. Забір крові у експериментальної тварини. 26
2.3.4.4. Отриманні та зберігання сироваток. 26
2.3.5. Аналіз отриманих антитіл проти PAMG-1 методом імуноферментного аналізу. 26
РОЗДІЛ 3 28
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ 28
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ 37
ВИСНОВКИ 39
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 40

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АГ - антиген

БСА - бичачий сироватковий альбумін

ЕФ - електрофорез

ЗФР - фізіологічний розчин NaCl, забуферений фосфатами (**P**hosphate-**b**uffered **s**aline, PBS)

ІФА - імуноферментний аналіз

ПААГ - поліакриламідний гель

ПАМГ-1 - плацентарний альфа-мікроглобулін-1 (**P**lacental **a**lpha **m**icroglobulin-**1**, PAMG-1)

ВСТУП

Кожного року у світі народжується 15 мільйонів недоношених дітей у результаті передчасних пологів. Останні визначають як пологи, що відбуваються до 37 тижня гестації і поділяють на дуже ранні (до 28 тижня), ранні (між 28 та 32 тижнями) та помірно ранні (між 32 та 37 тижнями) [1]. До того ж, проблема передчасних пологів постає першою причиною у контексті дитячої смертності - 1 мільйон серед недоношених дітей помирає у віці до 5 років. Також, як наслідки передчасних пологів спостерігаються затримка у розвитку, складність навчання, зорові та слухові проблеми [2].

Оскільки масштаби даної проблеми є настільки великими, недостатнім є підтримка критичного стану при ризику передчасних пологів та боротьби з наслідками. Важливим є завчасна діагностика та запобігання, які дають можливість уникнути передчасного народження дитини. У сучасному світі існують методи діагностики на виявлення ризику передчасних пологів, наприклад електрокардіографія плоду, вагінальне обстеження жінки на дослідження мікрофлори з метою вчасного виявлення інфекції, біохімічні дослідження білків амніотичної рідини [3]. Відомо, що біохімічне дослідження дозволяє виявляти маркери того чи іншого захворювання ще до початку його прояву, навіть маркери передчасних пологів.

Одним із таких маркерів є PAMG-1 (Placental alpha microglobulin-1) – білок амніотичної рідини, що слугує маркером передчасного розриву плідних оболонок, оскільки в нормі не спостерігається у шийко-вагінальному каналі вагітної жінки. Можливість виявити представлений білок у зразку зішкріба з цервікального канану дозволить реєструвати розрив оболонок ще на ранньому етапі та запобігти передчасним пологам [4].

Предмет дослідження: білок амніотичної рідини PAMG-1 як основний компонент діагностичної тест-системи на виявлення вірогідності передчасних пологів.

Об’єкт дослідження: детекція передчасних пологів за допомогою використання білку амніотичної рідини PAMG-1 як маркера передчасного розриву плідних оболонок.

Метою дослідження було отримати білок PAMG-1 з наступним створенням поліклональних антитіл проти PAMG-1 для діагностичної тест-системи на виявлення передчасних пологів.

Відповідно до мети, було поставлено наступні завдання:

1. Отримати чисті фракції білка PAMG-1 із зразка амніотичних вод;
2. Дослідити отримані фракції білка PAMG-1 на ступінь чистоти та розрахувати їх концентрацію;
3. Імунізувати лабораторну тварину (кролика) отриманим білком PAMG-1 в якості антигену з метою отримання антитіл проти даного білка;
4. Дослідити титр отриманих антитіла за допомогою непрямого твердофазного імуноферментного аналізу.

РОЗДІЛ 1
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Проблематика передчасних пологів.

На сьогоднішній день, у всьому світі гостро розглядається проблема дитячої смертності, істина причина якої достеменно не відома через відсутність фактичних даних із усіх країн, особливо з низьким рівнем матеріального достатку. Не дивлячись на це, передчасні пологи розглядаються як найперша та основна причина передчасних пологів.

За даними Всесвітньої Організації Здоров'я, передчасними пологи вважаються тоді, коли дитина народжується живою до 37 повних тижнів вагітності. За статистикою, щороку народжується 15 мільйонів передчасно народжених дітей, 1 мільйон з яких при цьому помирає. При цьому, особи, що вижили, найчастіше мають серйозні порушення із навичками навчання, візуальні та слухові проблеми. Важливо зазначити, що на рівень виживаності за факту передчасних пологів значно впливає коливання рівня достатку від країни до країни. Так, країни із низьким рівнем достатку мають вищий рівень дитячої смертності за причини передчасних пологів, оскільки новонароджені не отримують достатній рівень піклування, підтримуючі апарати та терапії, потерпають від інфекцій респіраторних шляхів [5].

1.1.1. Причини передчасних пологів.

Вивчаючи проблему передчасних пологів, важливо розуміти походження, а означає - причини. У сучасномі світі передчасні пологи вважаються синдромом, який може бути ініційований великою кількістю причин. Такі механізми як запалення або інфекційне захворювання, надмірне розтяжіння матки, матково-плацентарна ішемія або кровотеча, стресові та порушення, що опосередковані імунною системою. Незважаючи на таку велику кількість причин, єдиного механізму виникнення передчасних пологів на даний момент не було встановлено [6]. Відповідно, саме фактори ризику

найбільше приймаються до уваги для передбачення та контролю ризику передчасних пологів. Також, важливу роль відіграє саме взаємозв'язок усіх наявних факторів ризику, які значно підсилюються під час впливу на них вищезгаданими інфекційними захворюваннями або запаленнями [7].

Саме фактори ризику вивчають найбільше при дослідженні проблеми передчасних пологів, що має великий резон за декількох причин. Детальне вивчення даних факторів дає можливість створити набір характеристик, які дозволять виявити особи жінок та віднести їх до групи ризику. Передчасне виявлення означає початок спрямованого лікування з подальшою можливістю вчасно народженого плоду [8]. Такі дії ведуть до можливості визначення формування вибірки, що є невід'ємною частиною при дослідженні медичних проблем та дослідженні в цілому. Як результат - всі вищезазначені дії ведуть до викристалізовування певних механізмів, які призводять до явища передчасних пологів.

Відповідно до існуючих досліджень, було встановлено причинно-наслідковий зв'язок за певними характеристиками матері та плоду, що можуть сповістити про можливість передчасних пологів. До таких характеристик входили найрізноманітніші параметри, починаючи із типу харчування та історії хвороб у сім'ї та закінчуючи фізичними параметрами органів малого тазу жінки та встановленими генетичними маркерами вагітних особин [9].

Із загальних факторів ризику виділяють фактори, що відносять саме до материнських. Першим таким фактором є часовий проміжок між двома вагітностями. Було виявлено, що ризик передчасного народження плоду збільшується майже у два рази якщо часовий проміжок між вагітностями складає приблизно півроку [10]. Механізм, що спонукає до передчасних пологів за даних обставин не було встановлено, проте вважається, що є достатньо послідовним не повністю відновлений стан матки та наявність порушень під час наступної вагітності. Адже за обставин швидкого настання

наступної вагітності, матка не відновила свою повну функціональність, що унеможливлює здорове протікання останньої, а також знаходиться у запальному стані [11].

Не менш важливим є статус харчування вагітної жінки, а саме його зв'язок із таким важливим для вагітності параметром – індексом маси тіла (ІМТ). Якість та кількість вживаної їжі створює картину не тільки для індексу маси тіла, проте і для набору поживних речовин, вітамінів та макро- і мікроелементів. Тож, було показано, що не тільки під час вагітності, але і до вагітності низький індекс маси тіла може спровокувати самовільних передчасних пологів, тоді ж як ожиріння навпаки виступає протектором від даної проблеми.

Також, в контексті проблеми передчасних пологів активно вивчався стан різних аналітів сироватки крові. Було показано, що порівняно із досліджуваними зразками вагітних жінок із низьким рівнем цинку, заліза та фолієвої кислоти було більше випадків передчасних пологів, ніж у жінок, що під час вагітності мали достатній рівень концентрацій вищезазначених молекул [12]. Тут, як і у випадку із факторами ризику та інфекційними захворюваннями та запаленнями, відіграє роль взаємозв'язок: вагітні жінки із низьким індексом маси тіла скоріше за все споживають меншу кількість поживних речовин через продукти харчування. Низька вага, в свою чергу, призводить до зменшення об'єму крові та відповідно – кровопостачання матки.

У взаємозв'язку - низькі рівні вітамінів та мінералів пов'язують зі зменшенням кровотоку та підвищенням частоти інфекційних захворювань матері. В свою чергу, інша сторона проблеми з ІМТ – ожиріння – характеризується наявністю аномалій у народженого плоду. Найчастіше спостерігаються такі відхилення, як порушення нормального розвитку нервової трубки, а саме це є сильним триґером до передчасних пологів. Дуже часто у жінок з ожирінням реєструється діабет, або ж такі жінки схильні до

прееклампсії, а як перше, так і друге часто стає причинами випадків передчасних пологів [13].

Під час дослідження передчасних пологів на виборці жінок, беруть до увагу історію вагітностей. Так, особи із наявністю в історії випадку передчасних пологів, показують підвищення ризику випадку рецидиву 2,5 рази. Також, за реєстрації самовільних передчасних пологів саме у ранньому віці, є більша вірогідність рецидиву під час наступної вагітності. До уваги беруть і перманентні внутрішньоутробні інфекційні захворювання, що повторюються. Це слугує фактором високої вірогідності самовільних передчасних пологів жінки [14].

При дослідженні причин передчасних пологів також вивчають так звані характеристики вагітності. Така загальна назва об'єднує чітко визначені ознаки при вагітності, на які без виключення необхідно звертати увагу. Різного роду фізичні порушення та відхилення пов'язують із передчасними пологами: кровотеча, що пов'язана із відслоюванням плаценти або ж кровотеча, що не пов'язана із останнім, проте була зареєстрована у ранньому першому або другому триместрах – є дуже великим ризиком передчасних пологів. Звичайно, історія хвороб або ж наявні на час вагітності захворювання значно підвищують ризик передчасних пологів - в першу чергу захворювання щитоподібної залози, діабет та гіпертонія найчастіше пов'язують із причинами передчасних пологів внаслідок ускладнень у матері.

Аномалії матки або ж втручання у органи малого тазу – історія біопсії конуса шийки матки, оперативні втручання, наприклад електрохірургічне петльове висічення вторинне по відношенню до ракових станів шийки матки, пов'язані з ризиком спонтанних передчасних пологів. Проте не тільки набуті, але і вроджені аномалії матки значно впливають на підвищення ризику [15,16].

Психічний стан вагітної жінки вкрай важливий у питанні проблеми передчасних пологів. Незалежно від статусу, рівня медицини та поведінкових

факторів, ризик передчасних пологів збільшувався у два рази за психологічного або соціального стресу. Значно впливають стресові стани через нестабільні матеріальний стан та життєві умови. Механізм впливу таких стресових психологічних умов пов'язують із кортикотропіном - релізинг-гормоном у відповідь на стресові умови. Також, при дослідженні сироватки крові вагітних жінок на прозапальні маркери, наприклад С-реактивний білок, було припущено, що запальний процес, що посилюється стресовими станами, може бути одним із шляхів впливу на розвиток синдрому передчасних пологів [17].

Розповсюдженою причиною передчасних пологів є внутрішньоутробна інфекція. Інфекція є важливим механізмом при визначенні причини та її усунення. Механізм впливу інфекції, що викликає передчасні пологи, пов'язаний із вродженою імунною системою, яка активується у відповідь на запалення. Збудники інфекції розпізнаються рецепторами, що розпізнають патерни, наприкла, TLR (Toll-like receptors), останні викликають релізинг прозапальних хемокінів та цитокінів – IL8 (interleukin 8), IL1β (interleukin 1β) та TNF-α (tumour necrosis factor). На наступному етапі певні ендотоксини запальних агентів та прозапальні цитокіни слугують тригером для виділення медіаторів запалення, наприклад простагландинів, та ферментів, що руйнують матрикс. Всі ці хімічні агенти, а власне простагландини, є факторами, що стимулюють матку до скорочення, а руйнування внутрішньоклітинного вмісту в плідних оболонках викликає передчасний розрив плідних оболонок [18,19]. Інфекційні збудники здатні проникати в амніотичну порожнину певними різними шляхами, які важливо визначити задня унеможливлення повтору запалення. Відповідно, найбільш розповсюдженим шляхом проникнення є висхідний шлях із піхви та шийки матки і вважається, що вірогідніше таке проникнення відбувається саме на другому триместрі. Наступними шляхами є гематогенне розповсюдження мікроорганізмів через плаценту, розповсюдження в зворотному напрямку за

фалопієвими трубами та випадкове зараження через процедури, що потребували вторгнення у органи малого тазу. Колонізація мікроорганізмами може відбуватися як під час вагітності, так і до моменту формування плоду, проте не викликати при цьому симптомів. Час колонізації не грає ролі в контексті викликання передчасних пологів, оскільки саме щільне прилягання мембрани до оболонки матки, що відпадає (*decidua*) на періоді 20-го тижня вагітності, викликає запалення. Безсимптоматична колонізація мікроорганізмами (до чи під час вагітності) стає помітною, і такий активний розвиток запалення призводить до передчасних пологів [20,21].

Також, до причин відносять багатоплідну вагітність, яка зустрічається дуже рідко (2-3% від усіх вагітностей), проте, як наслідок - становить 15-20% усіх передчасних пологів. Так, 60% близнюків народжуються недоношеними або народжуються внаслідок спонтанних пологів. Більш численні багатоплідні вагітності майже завжди призводять до випадку передчасних пологів. При вивченні таких випадків було встановлено, що саме надмірне розтягування матки призводить до потуг, в свою чергу це - призводить до надриву навколоплідних оболонок. Беруть до уваги об’єм навколоплідних вод, що безпосередньо пов’язані із такою важливою проблемою, як передчасний розрив плідних оболонок. Замалий або ж надмірний їх об’єм призводить до передчасного надриву плідних оболонок, що є тригером до початку перейм [22].

Передчасний розрив плідних оболонок (Prelabor rupture of membranes - PROM) визначається як розрив плідних оболонок до 37 повного тижня гестації. PROM зустрічається у 3-4% від загальних вагітностей та постає великою проблемою в контексті передчасних пологів - у 50% передчасних пологів причиною постає саме розрив оболонок [23]. Поява розриву плідних оболонок може відбуватися різними шляхами, до яких відносять декілька груп факторів. Першочергово, це ускладнення, викликані інфекційними захворюваннями статевих шляхів вагітної жінки, наприклад хламідіоз,

бактеріальний вагіноз або гонорея; фактори, що виникають через поведінкові особливості: шкідливі звички, поганий рівень харчування, вживання наркотичних речовин; спостерігаються акушерські ускладнення, такі як фізіологічні проблеми шийки матки, кровотечі під час вагітності, травми, що існували до початку вагітності та можливість оперативного втручання в шику матки [24].

Вважається, що значний вплив завдають умови навколишнього середовища: знаходження у зоні значного забруднення, токсини, стресові умови. Власний організм може спровокувати розрив плідних оболонок, наприклад гормональні зміни або ж сигналінг ендокринної системи. Останній здатен викликати апоптоз плідних оболонок. До того ж, існує генетична схильність до ризику розриву плідних оболонок, саме тому важливим є вчасно виявляти дану проблему [25].

1.1.2. Роль державної медицини у проблемі передчасних пологів.

Система охорони здоров'я будь-якої країни перш за все спрямовує всі зусилля на профілактику пізніх передчасних пологів та передчасних пологів на ранніх строках (до 34 тижня). Така профілактика відбувається за допомогою соціальних кампаній та політичних втручань, що спрямовані на попередження та інформування суспільства, особливо важливим є попередження передчасних пологів до 39 тижня, які не були підтверджені медичними показаннями. Не зважаючи на наявність кампаній та значне приділення уваги даній проблемі, її вирішення є складним, оскільки комплексність та відсутність чіткого розуміння причин передчасних пологів не дає можливості уніфікувати підхід. Проте новітні технології та наукові дослідження даної теми дозволяють знизити рівень дуже передчасних пологі та пов'язані із ними захворювання [26].

Контроль системи охорони здоров'я будь-якої країни полягає у саме у контролі за даними та здоров'ям населення. Епідем Нагляд своєчасно збирає дані з вибірки на популяційному рівні щодо числа передчасних пологів та

факторів ризику, що були з ними пов’язані і подальші ускладнення або захворювання. Створюються програми та клінічні протоколи з акушерської допомоги, схеми нагляду за жінками з ризиком передчасних пологів [27]. На даному етапі в Україні організація ведення передчасних пологів передбачає наявність спеціальних стаціонарів з можливістю проводити потребуючі терапевтичні процедури та за потребою – реанімувати новонароджених дітей.

В Україні було створено оптимізований механізм ведення передчасних пологів. На першому етапі необхідно оцінити та спрогнозувати ступінь ризиків патологій, що пов’язані із порушеннями як у матері, так і у самому пренатальному процесі. Така оцінка дає змогу вчасно виявити момент необхідності переведення жінки на стаціонар з подальшим медичним наглядом. На другому етап для жінки встановлюють персоналізований план ведення пологів з урахуванням ризику передчасних пологів. Обов’язковим є укладання угоди на наявність погодження зі сторони вагітної жінки. Після погодження документацій та складеного плану на третьому етапі ведеться активний нагляд за станом жінки та плода. Також, враховується планування нагляду за плодом саме під час пологів [28].

На третьому етапі обов’язковим є реєстрація партограми – це графічна візуалізація динамічного спостереження процесу розкриття шийки матки вагітної жінки та просування голівки плода, що дає результати саме динамічного спостереження пологової діяльності [29]. Наступним, проводять профілактичні дії респіраторного дистрес синдрому. Така профілактика вважається доцільною до 34 тижня вагітності включно. Після переходу від ведення вагітності до пологів безпосередньо, оцінюється необхідність показань до знеболення пологів. На останньому етапі, після процесу пологів, оцінюють загальний стан новонародженого, створення ланцюгу тепла, проводять перші гігієнічні процедури, дають можливість спільного знаходження матері та новонародженої дитини відразу після пологів [30].

1.2. Діагностика передчасних пологів

Діагностика передчасних пологів перш за все проводиться з метою оцінки наявності станів та умов, що передують синдрому передчасних пологів. Наприклад, найчастіше реєструється плацентарна недостатність, вищезгадана висхідна інфекція, що найчастіше є причиною передчасних пологів, або ж зміна стану навколоплідних вод, біологічні маркери з яких часто слугують найточнішим способом завчасно визначити ранні пологи).

Як зазначалося раніше, визначення ступеня прогресії передчасних пологів є важливим етапом при складанні плану ведення вагітності жінки з наявністю даного синдрому. Визначення ступеня – одна із основних ідей діагностики, оскільки від цього залежить назначення необхідних аналізів та подальшого підтримання стану вагітної жінки. Для цього враховують характеристику перейм, стан шийки матки, в якому вона знаходиться під впливом потуг, та рівень передчасного розриву навколоплідних оболонок [31]. При діагностиці визначаються не тільки фізичні характеристики фізичного стану жінки, проте і стан плода з метою оцінки можливості та доцільності народжувати [32].

Для початку діагностування передчасних пологів необхідним є етап підтвердження наявності ризику або ж безпосередньо передчасних пологів. Підтвердження полягає у реєстрації чітко визначених ознак. Після 22 тижня визначаються болі у нижній частині живота, що нагадують болі при переймах. Також, з’являються виділення з піхви, що мають слизово-кров’яних або ж водянистий характер за умови відходження навколоплідних вод. Переймоподібні болі переходять у перейми з частотою 1 перейми протягом 10 хвилин протягом 15-20 секунд. Реєструється зміна локалізації та форми шийки матки, оскільки матка дуже стрімко скорочується та згладжується. Як і при звичайних пологах, спостерігається збільшення діаметру просвіту шийки, тобто розкриття. Далі, лікарі відзначають опущення голівки та сідниць плоду у малий таз матері. За наявності всіх

вищеперелічених ознак пологи відзначаються як передчасні. До того ж, існує певна кореляція між характером розширення та станом шийки матки та підтвердженням наявності передчасних пологів (Додаток 1) [33].

Для раціональної діагностики проводять певний перелік діагностичних тестів, кожен з який має різну мету. Проводять кардіотокографію - електрокардіографію плода – яка проводиться з метою встановлення характеру скорочень матки та стану плода загалом; проводять вагінальне обстеження вагітної жінки, що складає комплекс діагностичних тестів, наприклад, шийко-вагінальний мазок на показники стану мікрофлори та визначення вагінального pH для встановлення чи виключення наявності інфекції; з метою біохімічного дослідження білків амніотичної рідини беруть зразок амніотичної рідини, проте тільки за суворими показаннями, оскільки аналіз має достатньо травматичний характер забору; проводять біохімічний аналіз маркерів шийки матки у вигляді фібронектинового тесту або ж тесту на наявність фетального мікроглобуліну (PAMG-1).

З метою суб’єктивної оціки стану шийки матки проводять пальпацію останньої з використанням шкали бішопа для оцінки; лікарями проводиться трансвагінальне УЗД для встановлення довжини шийки матки; як зазначалося раніше, стан навколоплідних вод є вкрай важливим для стану передчасних пологів та самого плода, тому проводять внутрішньочеревне УЗД плоду з метою дослідження наступних станів: об’єм навколоплідних вод вказує на оліго- або багатоводність розвитку плода, УЗД для визначення картини розвитку плода проводять, щоб підтвердити або виключити порушення росту або макросомію, при визначенні на УЗД багатоплідної вагітності потрібно виключити дискордантний ріст всіх плодів [34, 35].

1.2.1 Біологічні маркери при діагностуванні передчасних пологів

При діагностуванні передчасних пологів першочергово необхідно визначитися із біологічною рідиною та джерелом останньої. Тому біологічні маркери отримують із крові та сечі вагітної жінки, виділень із цервікального

каналу у вигляді зішкрібу або ж напряму зразок навколоплідних вод, проте кров та виділення є найбільш дослідженими.

Тож, при дослідженні крові вагітної жінки, а точніше сироватки крові, важливо робити це в динаміці. Тому кров забирають декілька разів протягом періоду ведення вагітності (не враховуючи самі пологи). За допомогою дослідження біологічних маркерів в сироватці крові матері, було запропоновано певні шляхи виникнення передчасних пологів, а саме активація материнського або плацентарного гіпоталамо-гіпофізарно-наднирникової вісі (маркер патології - кортикотропін-релізинг гормон), запалення через інфекцію верхніх відділів статевих шляхів (визначають за маркером дефенсином або ж фактором некрозу пухлин), децидуальний крововилив або ешемія (маркером паталогії слугує тромбін-антитромбіновий комплекс III) [36,37].

Оскільки інфекція статевих шляхів є однією із перших причин розриву плідних оболонок та передчасних пологів, у світі активно досліджуються маркери нижніх відділів статевих шляхів. Найпоширенішим захворюванням нижніх статевих шляхів є бактеріальний вагіноз, який характеризується зміною бактеріального статусу піхви жінки із переважаючих лактобацил на грамнегативні анаеробні бактерії такі як *Gardnerella vaginalis* та *Bacteroides, Prevotella, Mobiluncus*, а також види *Mycoplasma*.

Вважається, що дане захворювання збільшує шанси передчасних пологів у два рази, при цьому не корелює із тижнем гестації. Дослідження вагітних жінок на виявлення груп ризику захворіти на бактеріальний вагіноз клінічно не є достатньо корисним, оскільки епідеміологічна ситуація із даним захворюванням є достатньо критична - висока розповсюдженість із високим ступенем захворюваності серед населення зменшують достовірність результатів. Не зважаючи на це, тести на бактеріальний вагіноз вважаються обов'язковими та рутинними [38].

Тестування на бактеріальний вагіноз вагітних жінок відбувається шляхом дослідження цервікального слизу на маркери передчасних пологів, таких як фетальний фібронектин, інтерлейкіни 6 та 8 (IL6, IL8), фактор некрозу пухлин альфа (TNF-) та матриксна металопротеїназа. Часто вживаним є біохімічний тест на фетальний фібронектин, оскільки даний маркер є найбільш досліджуваним та найчастіше використовується у клінічній діагностиці [39].

Фетальний фібронектин локалізується на децидуально-хоріонічній поверхні в межах матки та визначається як глікопротеїн фетального походження. При дослідженні даного білка як маркера передчасних пологів, було зазначено, що він визначається у зразку цервікального слизу у 3-4% вагітних жінок в межах від 21 до 37 тижнів гестації [40]. Фібронектин досліджували на доцільність використання у діагностиці на різних тижнях гестації.

У контексті прогнозування передчасних пологів до 35 тижня гестації використання фібронектину показало чутливість в межах від 20 до 30 % на 24 тижні вагітності. Прогнозування до строку 35 тижня гестації показала чутливість до 63%. Загалом, визначення рівня фетального фібронектину вважається найкращим тестом для виявлення ризику пологів протягом двох тижнів від моменту забору досліджуваної проби. Проте тестування на фібронектин з метою виявлення ступеня розродження до певного тижня гестації вагітності [41].

У світовій практиці для передбачення ризику передчасних пологів застосовують компіляцію різних маркерів з метою отримання більш точного результату. Такий метод використовують через неоднорідність причин самовільного розродження, в результаті чого клінічна цінність представлених для прогнозування маркерів значно знижується. Об’єднання маркерів дозволяють підвищити чутливість прогнозування через комбінування ризиків передбачення. Цінність прогнозування позитивного

результату збільшують за рахунок об’єднання показників таких маркерів як акушерський анамнез та довжина шийки матки жінки. Проте збільшення прогнозування позитивного результату зменшує чутливість прогнозу [42].

Не дивлячись на існування біомаркерів для визначення ризику передчасних пологів та можливість їх об’єднання для більш чутливого прогнозування, жодна із існуючих прогностичних моделей не забезпечує достатнього рівня користі для повсякденного клінічного використання. Розробка ефективної прогностичної моделі дозволить встановлювати ефективні цільові методи лікування, проте на даний момент існуючі поодинокі тести на виявлення біомаркерів передчасних пологів не є достатньо ефективними [43].

1.3. Плацентарний альфа-мікроглобулін-1 (PAMG-1) - білок амніотичної рідини вагітних жінок.

Плацентарний альфа-мікроглобулін-1 (Placental alpha microglobulin-1 - PAMG-1) вперше було досліджено у 1975 році у зразку амніотичної рідини. На сьогоднішній день даний білок визначається як один із основних маркерів передчасного розриву плідних оболонок, а означає - передчасних пологів. PAMG-1 визначають як маркер, оскільки реєструється у високих концентраціях у амніотичних водах вагітних жінок. Це дозволяє використовувати білок у діагностичних цілях, тобто детектувати, при дослідженні мазку із шийко-вагінального каналу вагітної жінки. При виявленні PAMG-1 у мазку роблять висновки щодо наявності навколоплідних вод у шийко-вагінальному каналі жінки, а відповідно - про випадок передчасного розриву плідних оболонок жінки [44].

1.3.1. PAMG-1 як маркер розриву плідних оболонок та передчасних пологів.

Плацентарний альфа-мікроглобулін-1 вважається ідеальним маркерним кандидатом на виявлення розриву плідних оболонок через високу концентрацію у амніотичній рідині вагітної жінки. Відомо, що концентрація

PAMG-1 у амніотичній рідині складає 2000-25000 нг/мл, що у 1000-10000 разів більше за його концентрацію у шийко-вагінальному каналі вагітної жінки з непошкодженими плідними оболонками, яка варіює в межах від 0,05 до 2 нг/мл [45].

Важливим для діагностики є те, що PAMG-1 не визначається в зразках сечі та сперми, у зразках материнської крові визначається у дуже низьких концентраціях, оскільки виділяється децидуальними клітинами. Відповідно, наявність інших біологічних рідин не впливає на позитивний результат діагностування. Детекцію PAMG-1 у досліджуваному зразку проводять на основі імунного аналізу з використанням моноклональних антитіл проти білка PAMG-1. Біологічний зразок для даного аналізу походить із шийко-вагінальних виділень вагітної жінки з точністю результату виявлення розриву плідних оболонок приблизно у 99% [46].

Проте, у 2014 році презентували тест-систему та дослідження, у якому було висвітлено порівняння неінвазивного тесту з інвазивним тестом прийнятого стандарту для діагностики розриву плідних оболонок. Було показано кореляцію у 99% між неінвазивним та інвазивним тестами. Такі результати дозволили дослідникам запропонувати використання саме неінвазивного тесту на виявлення PAMG-1, оскільки інвазивна процедура може тільки спровокувати розрив плідних оболонок і як результат - передчасні пологи [47,48].

РОЗДІЛ 2
ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. ОБ'ЄКТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У якості об'єктів дослідження у даній роботі виступали: амніотична рідина вагітних жінок, білок амніотичної рідини фетальний альфа-мікроглобулін (PAMG-1), поліклональні антитіла до білку PAMG-1.

2.2. МАТЕРІАЛИ

2.1.1. Реактиви.

У ході виконання роботи було використано наступні реактиви: Трис, HEPES, SDS ("Helicon", Росія); акриламід ("Bio-Rad", США); β-меркаптоетанол, гліцерин ("Merck", Німеччина); TEMED, бромфеноловий синій, кумасі G250; 10% LaCl3 (Sigma, США); Na2HPO4 (Cepham Life Sciences, США); (NH4)2SO4 (Cepham Life Sciences, США); Li2SO4 (Ereztech, США); NaCl ("Merck", Німеччина); TrisHCl (Sigma, США); ад'юванті Фрейнда; буферний розчин PBS: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na2HPO4 10 mM, KH2PO4, 1,8 mM: ; буферний розчин PBST: NaCl ("Merck", Німеччина) 137 mM, KCl (Sigma, США) 2,7 mM, Na2HPO4 (Cepham Life Sciences, США) 10 mM, KH2PO4 (Sigma, США), Tween-20 (Sigma-Aldrich, США); ABTS A1888-5G (Sigma, Canada);

2.1.2. Обладнання.

Для виконання роботи було використано таке обладнання: пластикові пробірки ("Eppendorf", Німеччина), пластикові флакони, мірний циліндр, спектрофотометр UV-2100 ("UNICLO", США), електрофоретичний прилад VE10 ("Helicon", Росія), джерело постійного струму УС135 ("EC Apparatus Corporation", США), центрифуги 5414R ("Eppendorf"), Uvicord SII 2238 ("LKB Bromma", Austria), LKB bromma Recorder 2211 ("LKB", Austria), StatFax 2600 ("Awareness Technology", США), Dry Block TDB-120 (BioSan, Англія), Chromate Microplate Reader ("Awareness Technology", США).

2.3 МЕТОДИ

Білок PAMG-1 отримували із амніотичної рідини жінок, що перенесли операцію кесарів розтин. Для очищення білка від домішок інших молекул, які присутні у амніотичній рідині, використовували методи поступового висолювання та центрифугування. Отриману на останньому етапі висолювання фракцію наносили на хроматографічну колонку для гель-фільтраційної хроматографії з метою розділення вмісту зразку за молекулярними масами.

З відібраних згідно молекулярної маси фракцій відібрали аліквоти для постановки SDS-електрофорезу з метою перевірки чистоти та приблизної концентрації PAMG-1 у зразках після етапу очистки. За результатами електрофорезу відбирали зразки, які є із найвищим ступенем чистоти. Концентрацію відібраних зразків визначали за допомогою програми Image Studio Lite. Зразки із встановленими концентрацією та ступенем чистоти використовували для імунізації лабораторної тварини (кроля) з метою створення поліклональних антитіл проти білку PAMG-1 для конструювання тест-системи на визначення передчасних пологів на основі білку PAMG-1 як кінцевої мети. Після всіх етапів імунізації забирали кров для постановки імуноферментного аналізу, таким чином проводячи скринінг отриманих антитіл.

2.3.1. Очищення PAMG-1 з амніотичної рідини.

Оскільки амніотична рідина не гомогенна та містить плаваючі частинки, спочатку рідину центрифугували при +4 С при 2000-3000 rpm протягом 30-40 хвилин. Отриманий супернатант відбирали, утилізувавши осад, фільтрували через паперовий рушник (фільтрувальний папір занадто щільної структури для даної біологічної рідини). Вимірювали об’єм за допомогою мірного циліндра. Додавали 1/19 об’єму 10% LaCl3, кінцева концентрація якого має складати 0,5%, та залишали інкубуватися 18 годин при +4 С.

Через 18 годин повторно центрифугували при +4 С при 3000 rpm протягом 60 хвилин. Супернатант утилізувади, до осаду додавали ½ початкового об'єму насиченого розчину Na2HPO4. Вищезазначений осад подрібнювати так, щоб шматки мали розмір 1х1х1 мм. Після цього інкубували на ротер-шейкері протягом 90 хвилин за кімнатної температури. Далі центрифугували при кімнатній температурі та 2000-3000 rpm протягом 20-30 хвилин, окремо відбирали супернатантЮ до якого додавали рівний об'єм насиченого (NH4)2SO4, перемішували та інкубували протягом 18 годин за температури +4 С.

Після інкубування центрифугували за +4 С при 3000 rpm протягом 60 хвилин. До осаду додавали ⅙ початкового об'єму дистильованої води та 1,5 об'єму насиченого Li2SO4 та знову інкубували протягом 18 годин при +4 С. Після останньої інкубації центрифугували за +4 С при 3000 rpm протягом 60 хвилин. Осад розчиняли у 0,5-2 мл буферного розчину для хроматографії та центрифугували протягом 10 хв при 13400 rpm. Вимірювали поглинання супернатанту на спектрофотометрі при довжині хвилі 280. Отриманий зразок наносили на хроматографічну колонку [49].

2.3.2. Гель-фільтраційна хроматографія.

Гель-фільтраційну хроматографію виконували на завершальному етапі очистки. Методом абсолютної калібровки з використанням альбуміну попередньо було побудовано графік градуювання для можливості визначення білку PAMG-1 на хроматограмі - залежність сигналу приладу від об'єму рухомої фази. Розмір хроматографічної колонки - 1,2х77 см, об'єм - 87 мл. У якості нерухомої фази використовували носій із розміром пор у гранулах 50 нм. У якості рухомої фази та розчину для врівноваження колонки використовували Буферний розчин для хроматографії (50 mM NaCl, 50 mM Tris HCl). Налаштування приладу для препаративного розділення високомолекулярних біологічних речовин (LKB bromm Uvicord 2238) були наступними: діапазон поглинання (AbsRange) - 0,2-0,5; часова константа - 1;

налаштування двохканального записувального приладу (LKB bromm Recorder 2211), перший канал (червоний самописець) на чутливості 50, другий канал (синій самописець) – 10, швидкість елюції – 0,5 мм/хв.

Після врівноваження колонки вносили аналіт в об'ємі 0,5-2 мл. Вільний об'єм хроматографічної колонки - час від моменту нанесення аналіта до моменту реєстрації максимума хроматографічного піку - складає 30-35 мм. Після досягнення хроматографічного піку починали збирати елюйовані фракції у кількості 10-12 одиниць по 2 мл у 15 мл лабораторні пробірки. Із зібраних фракцій готували зразки для нанесення на диск-електрофорез. Після цього фракції підготували до зберігання: до об'єму фракції було додано рівний об'єм (NH4)2SO4, зберігали за температури 4 С [49].

2.3.3. Електрофорез отриманих зразків PAMG-1.

Після гель-фільтраційнійної хроматографії було проведено диск-електрофорез білків з отриманих фракцій. Метод відтворювали у вертикальних пластинах із використанням буферних розчинів Леммлі. Для постановки методу використовували 7-22% градієнтні поліакриламідні гелі (ПААГ), товщина яких сягала 1 мм. Використовували електрофоретичний прилад VE10 iVE20 (Helicon, Росія) при величині постійного струму у 3 А в концентруючому та розділяючому гелях. До складу концентруючого гелю входили наступні компоненти: суміш акриламіду та бісакриламіду 40%:0,8% відповідно, 125 мМ Tris HCl, pH 6,8 10%SDS, 0,1%ПСА та по 3 мкл TEMED на кожні 2 мл гелю. Склад розділяючого гелю був наступним: суміш акриламіду та бісакриламіду 40%:0,8% відповідно, 375 мМ Tris HCl, pH 8,7, 10%SDS, 0,1% ПСА, 10 мкл TEMED на кожні 10 мл. Джерелом постійного струму слугував прилад EC135 ("EC Apparatus Corporation", США). У камеру для електрофорезу заливали Tris-гліциновий буферний розчин (з 5% SDS, pH 8,3) для проведення струму.

Перед нанесенням проби готували за методикою Леммлі: вносили в п'ятикратний SDS буфер, до складу якого входили 4% SDS, 20% гліцерин, 0,01% бромфеноловий синій, 125 мМ Tris HCl, pH 6,8 2,5%-β меркаптоетанол,

а в якості лідируючого барвника використовували бромфеноловий синій. Для приготування проб відбирали 20 мкл зразку з кожної зелюйованої фракції та додавали 5 мкл буферу для зразків. Після приготування проби протягом 5 хвилин кип'ятили. Після електрофорезу гель забарвлювали 0,15% розчином діамантового синього Coomassie G250 ("Ferak", Німеччина) у суміші, до складу якої входили вода, етанол та оцтова кислота у співвідношенні 6:3:1 відповідно [50].

2.3.3.1. Об'єднання фракцій із найвищим ступенем чистоти та розрахунок концентрації PAMG-1.

Згідно з результатами електрофореграми окремо відбирали зразки із найвищим ступенем чистоти та об'єднували шляхом перенесення фракцій у одну лабораторну пробілку. Далі рахували концентрацію за допомогою аналітичної програми Image Studio Lite. Зразки PAMG-1 із визначеною концентрацією та ступенем чистоти використовували для імунізації лабораторної тварини (кроля) за класичною схемою. Концентрацію розраховували наступним чином: після диск-електрофорезу, SDS-PAGE гель продовжували аналізувати у програмному забезпеченні для кількісної оцінки відносної концентрації білків для Вестерн-блот аналізу – Image Studio Lite.

Для розрахунку відносної концентрації зразків, попередньо наносили калібрування з використанням альбуміну великої рогатої худоби. На зображені гелю, у програмному забезпеченні відмічали зони калібрування альбуміном та реєстрували сигнал у вигляді числового значення. За допомогою отриманих значень та відомих концентрацій калібрування, побудували калібрувальну пряму у програмі Exel. Концентрації білка PAMG-1 у білкових зонах SDS-PAGE гель розраховували відносно калібрувальної прямої.

2.3.4. Імунізація лабораторної тварини (кроля) попередньо отриманою фракцією білка PAMG-1.

Лабораторну тварину імунізували за класичною чотирьохетапною схемою з наступними концентраціями антигену (білку PAMG-1): I імунізація - 500 мкг PAMG-1, II імунізація - 250 мкг PAMG-1, III імунізація - 250 мкг

PAMG-1, VI імунізація - 250 мкг PAMG-1. Кожну індукцію проводили з часовим проміжком у два тижні. Після чого забирали не менше 10 мл крові з вени вуха кроля для скринінгу на якість та активність отриманих антитіл після кожної індукції.

2.3.4.1. Підготовка антигену (білку PAMG-1) до імунізації.

Оскільки кожен етап імунізації передбачає чітко визначені концентрації антигену, спочатку було відібрано із фракцій з визначеними концентраціями потрібний об'єм білка, який відповідав концентрації 500 мкг під час першої імунізації, та по 250 мкг - для наступних імунізацій. Оскільки фракції зберігали в суміші з (NH4)2SO4, відібраний об'єм центрифугували протягом 15 хвилин за 13400 rpm за температури 4 С. Після центрифугування супернатант забирали та утилізували, осад розчиняли у 500 мкл PBS в повному ад'юванті Фрейнда для першої імунізації, та в неповному ад'юванті Фрейнда - для наступних імунізацій.

2.3.4.2. Методика проведення ін'єкцій лабораторній тварині.

Кролика (вік - 2 місяці) імунізували підшкірно по всій протяжності хребта. Під час першої імунізації підшкірні ін'єкції здійснювали у 10 точках, в наступні імунізації - у 4 точках.

2.3.4.3. Забір крові у експериментальної тварини.

Забір крові здійснювали на 7, 14 та 21 день від останньої ін'єкції з крайової вушної вени в об'ємі 10 мл.

2.3.4.4. Отриманні та зберігання сироваток.

Отриману кров інкубували протягом 1 години за температури +37 С, після цього витримували за температури +4 С протягом 24 годин. Відокремлену сироватку крові центрифугували протягом 25 хв при 7000 rpm за +4 С.

2.3.5. Аналіз отриманих антитіл проти PAMG-1 методом імуноферментного аналізу.

Скринінг отриманих антитіл проводили за допомогою непрямого твердофазного імуноферментного аналізу. На першому етапі відбувається адгезія антигена до плоскодонного планшета. Антиген, розчинений у PBS до

концентрації 10 мкг/мл розносили 8-ми канальними самплерами у лунки ПВХ (полівінілхлоридного) трьох плоскодонних стріпів із 8 лунками фірми Nunc (Данія) по 100 мкл/лунку. Далі інкубували антиген на пластику протягом ночі (приблизно 20 годин) за температури +4 С. Після цього видаляли антиген, що не зв'язався, із лунок та шестикратно промивали 300 мкл/лунку за допомогою PBS з 0,1% Tween-20 (PBST), на шостий раз PBST залишали у лунках. Промивали за допомогою вошера StatFax 2600 (Awareness Technology, США). На другому етапі відбувається блокування вільних сайтів зв'язування. Стріпи з лунками, заповненими PBST, інкубували протягом ночі (приблизно 20 годин) за температури +4 С. Далі видаляли PBST лунок та шестикратно промивали 300 мкл/лунку PBST за допомогою StatFax 2600 (Awareness Technology, США).

На третьому етапі відбувається інкубація з первинними та вторинними антитілами. Вносили у відповідні лунки 100 мкл сироватки у певних розведеннях (Додаток 2) та інкубували 1 годину при +37 С. Після інкубації видаляли PBST з антитілами, які не зв'язалися, з лунок та шестикратно промивали 300 мкл/лунку PBST. У лунки вносили по 100 мкл вторинних коньюгованих антикролячих антитіл (Sigma, США) у розведенні 1:1000. Видаляли PBST з антитілами, які не зв'язалися, з лунок та шестикратно промивали 300 мкл/лунку PBST. На останньому етапі імуноферментного аналізу відбувається детекція антитіл. Вносили робочий розчин субстрату (ABTS A1888-5G (Sigma, Canada) - 5 мг; цитратний буфер, pH=4,8 - 2,5 мл; H2O2 60% - 5 мкл; дистильована вода - 7,5 мл) по 100 мкл у одну лунку. Виміряли поглинання лунок при довжині хвилі 405 нм без диференційного фільтра з використанням бланка на мікропланшетному рідері з часом експозиції 3, 7 та 11 хвилин.

РОЗДІЛ 3
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Представлена робота була присвячена отриманню та дослідженню необхідних компонентів для створення діагностичної тест-системи на визначення передчасної вагітності на основі білку амніотичної рідини PAMG-1. Білок PAMG-1 розглядається як маркер передчасних пологів, оскільки дана молекула не реєструється у шийко-вагінальному каналі за нормального протікання вагітності.

При передчасному розриві навколоплідних оболонок, PAMG-1 із амніотичних вод потрапляє у цервікальний канал жінки і білок можна детектувати у зразках цервікального слизу та вагінальних виділеннях. В даній роботі було опрацьовано 11 зразків амніотичних рідин різних жінок на різних строках (від 20 до 31 тижня), але тільки в 4 із них виявлено білок PAMG-1, результати яких і було опрацьовано та представлено.

Відповідно до хроматограми елюйованих фракції в межах молекулярної маси білка PAMG-1. Молекулярну масу встановлювали за попереднім методом абсолютного калібрування з використанням альбуміну великої рогатої худоби як стандарт. Зібрані фракції досліджено на чистоту, якісний та кількісний вміст за допомогою диск-електрофорезу в денатуруючих умовах з використанням білкових маркерів молекулярної ваги (PageRuler, Catalog number: 26630). Встановлено, що зразки із найвищим ступенем чистоти відповідають ділянці спаду на графіку хроматографії (Рисунок 1, 2). Ділянка спаду відповідає фракціям номер 9, 10, 11,12, 13 і позначена на Рис 1.2 як «9», «10», «11», «12», «13» .

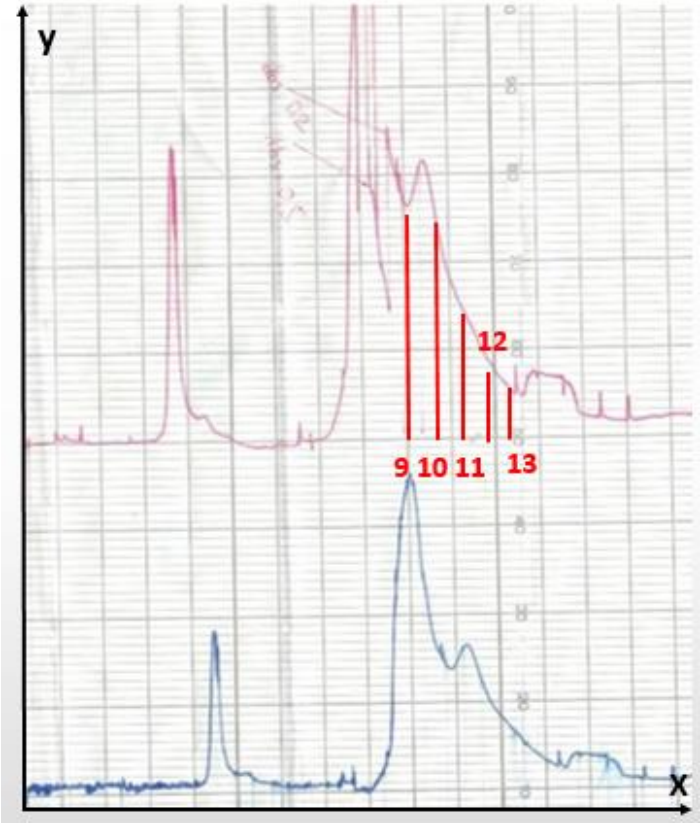

Рисунок 3.1. Хроматограма елюції білка PAMG-1. Вісь x – об’єм рухомої фази;

вісь y – сигнал (ABS) прилада (OD_{280}); фракції 9, 10, 11, 12, 13 – фракції з вмістом білка PAMG-1 із найвищим ступенем чистоти. Відповідно до отриманої хроматограми, можна зазначити про доцільно обраний тип носія та його ступінь фракціонування. TOYOPEARL HW-50 носій із розміром пор 12,5 нм та розрахований для гель-фільтраційної хроматографії білків молекулярною масою в межах 500-80000 Да [51]. Оскільки молекулярна маса білка PAMG-1 складає 34000 Да, носій є сумісним із розмірами молекули розділення.

Також, оцінили об’єм та концентрацію зразка. Оскільки роздільна здатність гель-фільтраційної хроматографії залежить від невеликого об’єму нанесеного зразка. Згідно теоретичних даних, об’єм нанесення не має перевищувати 1-5% від загального об’єму носія в колонці та в концентрації не більше, ніж 20 мг/мл [52]. Емпіричним шляхом встановлено, що для якісного

розділення зразку об’єм нанесення має бути у розмірі 1,15% від загального об’єму носія. Враховуючи те, що за літературними даними концентрація білка PAMG-1 не перевищує допустиму концентрацію білка для гель-фільтраційної хроматографії у розрахунку мг/мл [53], обраний метод гель-фільтраційної хроматографії є ефективним для останнього етапу очищення.

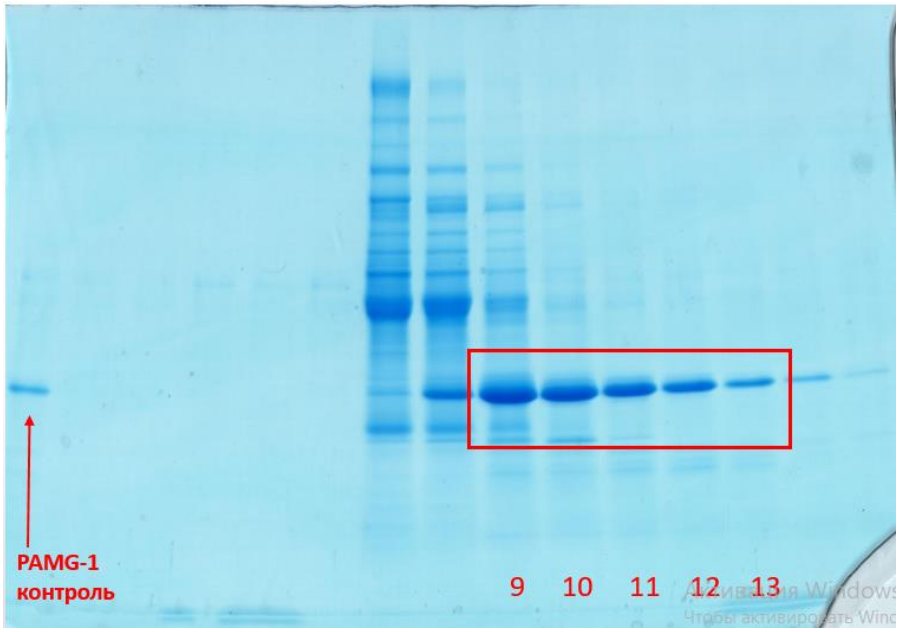

Рисунок 3.2. Електрофореграма білка PAMG-1 на гель-фільтраційній хроматографії. Зазначені плями 9, 10, 11, 12, 13 – відповідні зелюйовані фракції від хроматографії, об’єм нанесення 15 мкл/лунка. PAMG-1 контроль – попередньо очищена фракція білка PAMG-1, об’єм нанесення 5 мкл.

Якісний результат гель-фільтрації визначали як ступінь чистоти зразків – оцінювали кількість домішок інших білків, які присутні у білкових зонах з PAMG-1 за допомогою програмного забезпечення Image Studio Lite. Схожі за ступенем чистоти зразки об’єднували та визначали концентрацію за даними диск-електрофорезу та аналітичних програм.

За допомогою диск-електрофорезу змогли розділити білки з отриманих хроматографічних фракцій та розрахувати концентрацію PAMG-1. В перспективі, препаративний електрофорез може слугувати для елюції

білкової зони PAMG-1 із SDS-PAGE-гелю. Білки, які отримані таким методом, успішно застосовуються у ряді експериментів, враховуючи в якості антигену для отримання антитіл [54].

Таким чином опрацювали 4 зразки амніотичної рідини, результати яких порівняли між собою. За отриманими результатами встановили, що концентрація білку PAMG-1 в досліджених амніотичних рідинах коливається в межах від 0,005 мкг/мл до 0,043 мкг/мл. Враховуючи те, що досліджені рідини забрано на різних тижнях гестації, було оцінено залежність концентрації білка PAMG-1 в зразку від тижня гестації. Зафіксовано зниження концентрації білку зі збільшенням тижня гестації (Рисунок 3).

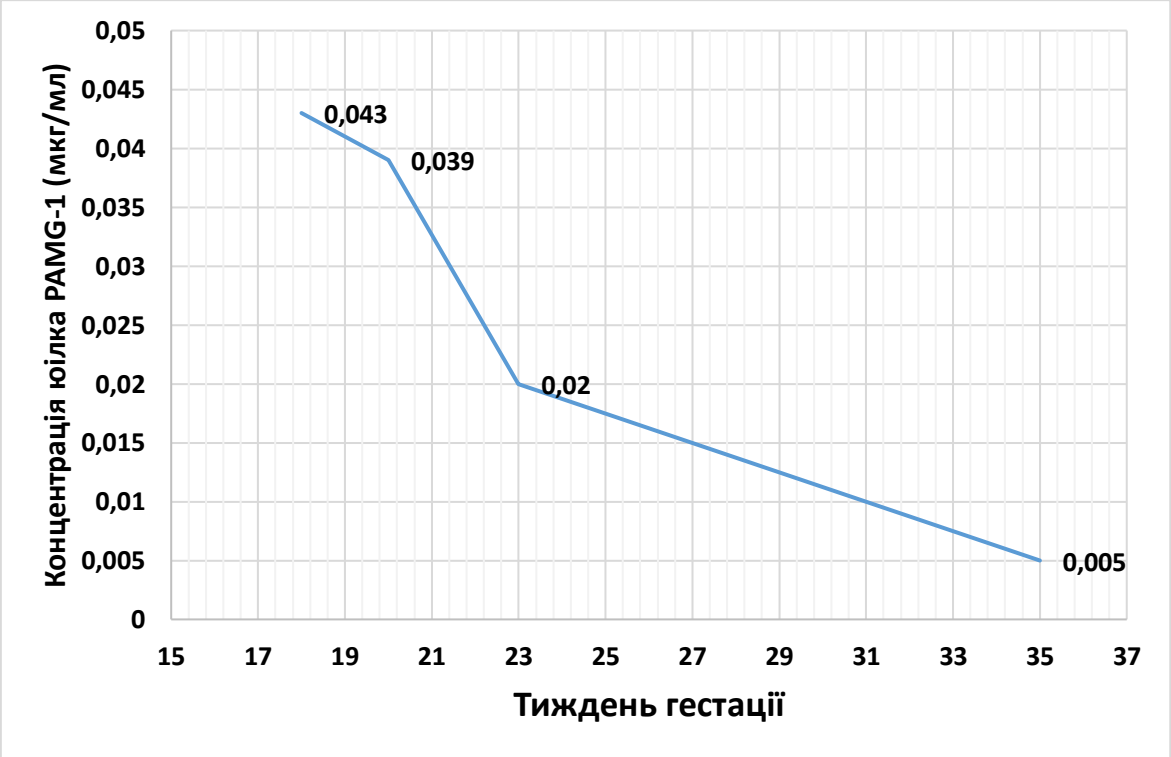

Рисунок 3.3. Графік залежності концентрації білка PAMG-1 від тижня гестації.

Відповідно, середнє значення концентрації PAMG-1 у досліджуваних зразках амніотичної рідини становить 0,026 мкг/мл. У попередніх дослідженнях авторами показано, що концентрація PAMG-1 у амніотичній рідині

максимально досягає 0,02 мкг/мл [55]. В отриманих результатах спостерігали значення, що перевищують зазначену концентрацію. PAMG-1 та його концентрація вивчається науковцями в контексті передчасних пологів, що відповідає 25-37 тижням гестації.

Зразки амніотичних рідин, які досліджували у представленій роботі, отримували в якості абортивного матеріалу за попередньою згодою пацієнток, відповідно, вони мали до 25 тижня гестації. Концентрація PAMG-1 вища на більш ранніх термінах, оскільки об'єм амніотичної рідини збільшується із тижнем гестації. Отримані значення концентрації перевищують літературні дані, оскільки зразки амніотичної рідини забрано на дуже ранніх термінах.

Також, визначили концентрацію білка PAMG-1 у загальному об'ємі зразка, яка максимально складає 4,339 мкг. Розрахунки проводилися на кількість амніотичної рідини в об'ємі 100 мл. (Рисунок 4).

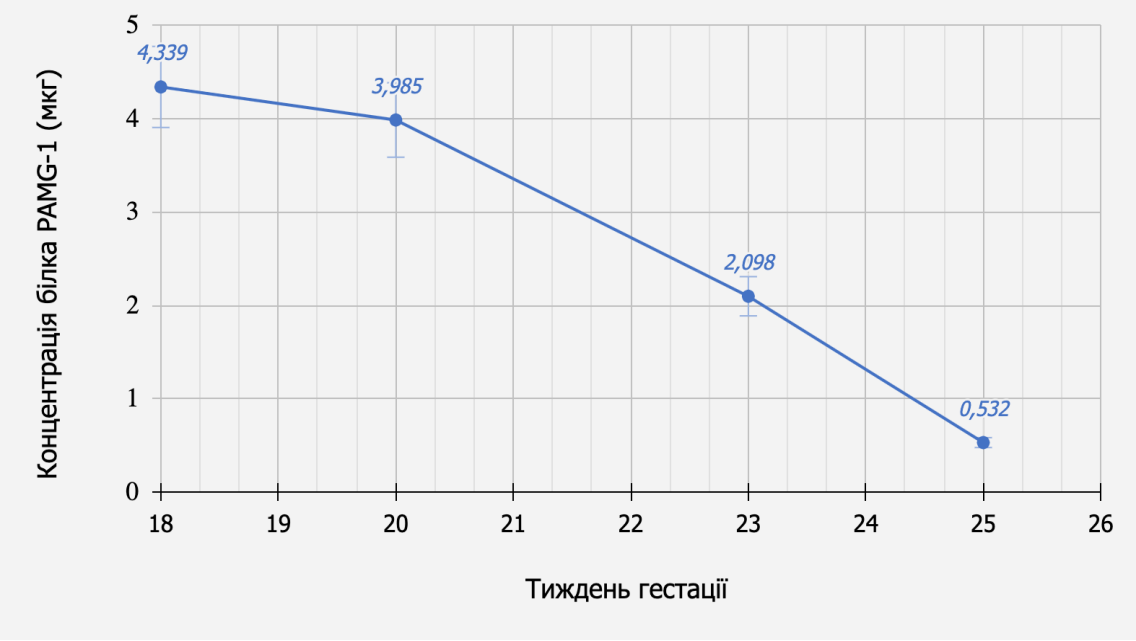

Рисунок 3.4. Концентрація білка PAMG-1 у загальному об'ємі амніотичної рідини в залежності від тижня гестації.

Відповідно до комерційного тесту «AmniSure ROM Test» на визначення розриву плідних оболонок шляхом детекції білка PAMG-1 у вагінальних виділеннях, необхідна мінімальна концентрація для виявлення PAMG-1 антитілами становить 5 нг/мл [56]. Методи очищення та елюції PAMG-1 в даній роботі дозволяють отримувати білок в значно вищих концентраціях, що відкриває багато можливостей для досліджень.

Специфічність отриманих антитіл напряму залежить від чистоти білку, яким було імунізовано тварину. Будь-які домішки у зразку впливають на чистоту сигналлу, який отримується при постановці імуноферментного аналізу для детекції зразків отриманими поліклональними антитілами. Домішки створюють додаткову відповідь антитіл, а отже – сигнал, який викривлює кількісні результати методу. Тому вкрай важливо на етапі очистки було отримати білок із високим ступенем чистоти, що і було досягнуто згідно результатів диск-електрофорезу.

Для отриманих поліклональних антитіл визначали оптичну густину за стандартною методикою непрямого твердофазного імуноферментного аналізу з використанням антивидових антитіл, які мічені пероксидазою хрона (Sigma) у двух повторностях. Оскільки оптична густина знаходиться в прямій залежності від кількості досліджуваних антитіл проти білка PAMG-1 у зразку, тому результати оцінювали саме по цій величині з відніманням значення бланку.

Для тестування використовували антитіла 3 різних сироваток (розведення 1:500 та 1:1000), відповідно до дня забору крові після останньої ін’єкції: 7, 14, 21 дні забору, та сироватку не імунізованого кролика (Додаток 2). Сироватку з антитілами після проведення циклу імунізації кролика перевіряли на величину титру антитіл у порівнянні із сироваткою не імунізованого кролика. Результати імуноферментного аналізу показали позитивний результат – зміну значень оптичної густини специфічних до PAMG-1 IgG у сироватках різної доби забору. Це свідчило про наявність

імунної відповіді у кролика та появу антитіл проти білка PAMG-1. Зареєстрували ріст рівня антитіл, який коливається у межах від 0,823 до 1,061 од (OD_{405}) і від 0,662 до 0,905 од(OD_{405}) при розведеннях сироватки 1:500 та 1:1000 відповідно (з поправкою на значення бланку) (Рисунок 5).

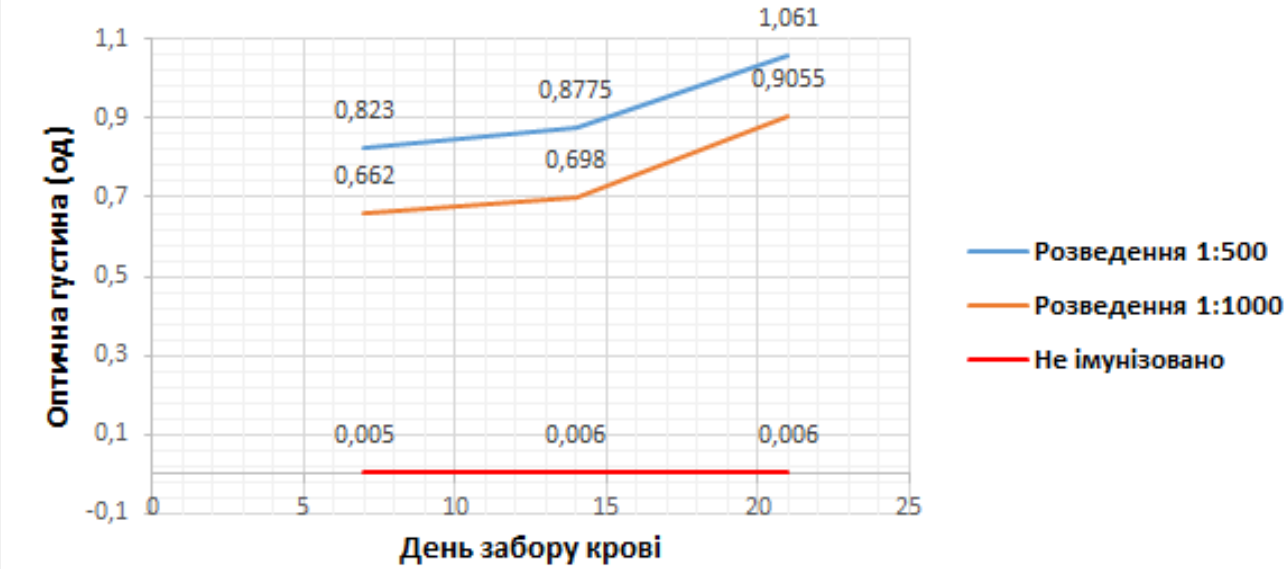

Рисунок 3.5. Результат імуноферментного аналізу на детекцію антитіл проти білку PAMG-1.

Також, отримані дані оптичної густини специфічних до PAMG-1 IgG у сироватках було оцінено за допомогою програмного пакету даних Statistica 8 та визначено середнє значення і стандартне відхилення (Рисунок 6). Було встановлено, що широке дослідження даного експерименту статистичними методами не є доцільним, оскільки $p>0,2$.

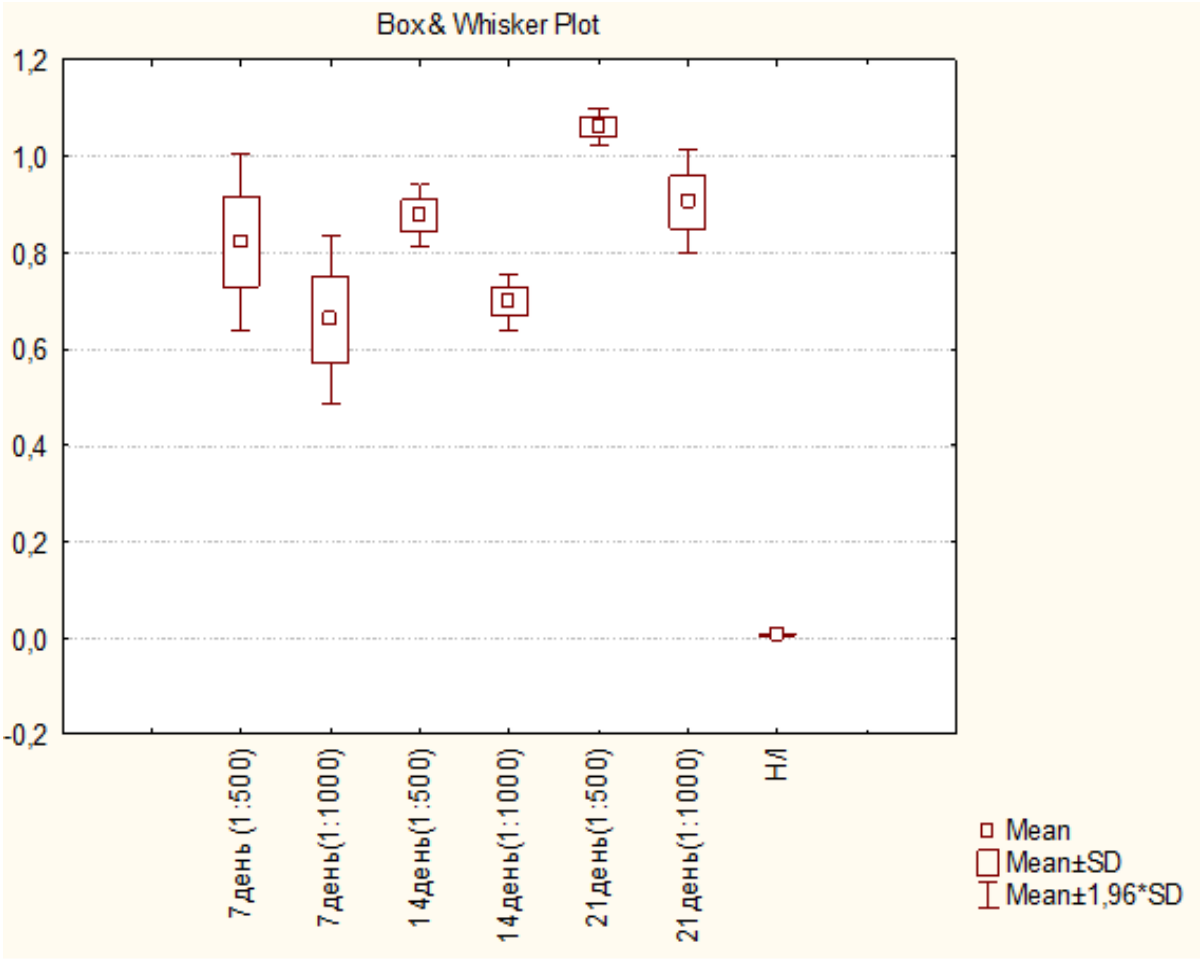

Рисунок 3.6. Графік Box and Whisker Plot оцінки даних оптичної густини антитіл проти PAMG-1.

Під час дослідження реєстрували достатньо сильну імунну відповідь, яку оцінювали за значеннями оптичної густини специфічних до PAMG-1 IgG. Отримані результати демонструють ефективність імунізації, як методу для отримання специфічних антитіл.

Ряд досліджень на тему виявлення ризику передчасних пологів вказують на ефективність застосування біомаркерів [57,58]. В основі існуючих на сьогоднішній день діагностичних тестів лежить використання високоспецифічних моноклональних антитіл проти молекулярних маркерів передчасних пологів [59,60]. Така технологія дозволяє детектувати білки амніотичної рідини в зразках вагінальних виділень вагітних жінок в дуже

низьких концентраціях, тест-системи на основі моноклональних антитіл є неінвазивними, простими у інтерпретуванні результату та простими у використанні.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Виконана робота присвячена отриманню чистої фракції білка PAMG-1, імунізації лабораторної тварини екстрагованим білком та найголовніше – отриманню поліклональних антитіл проти PAMG-1 – ключового компонента діагностичної тест системи на виявлення передчасних пологів.

Опрацьовано 11 зразків амніотичної рідини, проте тільки у 4 із них детектовано білок PAMG-1, саме тому у представленій роботі оцінка даних будується на 4 зразках із позитивними на PAMG-1 амніотичних рідин. Шляхом поступових методів центрифугувань та висолювань отримано зразок для останнього етапу очищення білка методом гель-фільтраційної хроматографії. Отримані фракції нанесено на диск-електрофорез.

За результатами електрофореграми відібрано 5 елюйованих фракцій PAMG-1 з подальшою оцінкою їх ступеня чистоти та розрахунком концентрації білка у об’ємі кожного із зразків амніотичної рідини. Показано коливання концентрації білка PAMG-1 в межах від 0,043 мкг/мкл до 0,005 мкг/мл. Враховуючи те, що досліджені рідини забрано на різних тижнях гестації, оцінено залежність концентрації білка PAMG-1 в зразку від тижня гестації. За результатами дослідження, зафіксовано зниження концентрації білку зі збільшенням тижня гестації.

На наступному етапі проведено цикл імунізації кролика отриманим за класичною 4-етапною схемою та досліджено сироватку крові на рівень специфічних до PAMG-1 IgG. Досліджували сироватки крові, які було отримано із крові, відібраною на 7, 14 та 21 дні після останньої ін’єкції. За результатами непрямого твердофазного імуноферментного аналізу спостерігали ріст значень оптичної густини специфічних до PAMG-1 IgG від 0,823 до 1,061 од (OD_{405}) і від 0,662 до 0,905 од (OD_{405}) при розведеннях сироватки 1:500 та 1:1000 відповідно (з поправкою на значення бланку) від 7 до 21 дня після останньої ін’єкції.

Отримані результати щодо ефективності імунізації, імунної відповіді кролика, показників оптичної густини специфічних до PAMG-1 IgG вказують на те, що отримані антитіла є ефективними для використання у наступних дослідженнях, створенні моноклональних антитіл та конструюванні діагностичної тест-системи на передчасні пологи.

ВИСНОВКИ

1. Було опрацьовано 11 зразків амніотичної рідини, у 4 з яких виявлено та отримано фракції білка PAMG-1 із амніотичної рідини вагітних жінок;
2. За допомогою електрофореграми та аналітичних програм встановлено ступінь чистоти отриманих фракції та розраховано концентрацію білка PAMG-1, яка коливається в межах від 0,043 мкг/мл до 0,005 мкг/мл. Було виявлено тенденцію до зниження концентрації білка зі збільшенням тижня гестації;
3. Проведена імунізація кролика білком PAMG-1, в результаті якого методом непрямого твердофазного імуноферментного аналізу було виявлено наявність поліклональних специфічних IgG проти даного білка;
4. Проведено тестування отриманих поліклональних IgG проти білка PAMG-1 методом непрямого твердофазного ІФА та встановлено наступне:

   - Зареєстровано появу оптичного сигналу в сироватках з крові імунізованого кролика, відібраної на 7, 14, 21 день після останньої ін’єкції імунізації, порівняно із сироваткою неімунізованого кролика. Це свідчить про позитивний результат проведеної імунізації та формування антитіл проти білка PAMG-1;

   - Спостерігали ріст рівня специфічних до PAMG-1 IgG у зразках сироватки майже у 2 рази між 7 та 21 днем відбору крові після останньої ін’єкції, результати якого реєстрували як значення оптичної густини, від 0,823 до 1,061 од (OD_{405}) і від 0,662 до 0,905 од (OD_{405}) при розведеннях сироватки 1:500 та 1:1000 відповідно (з урахуванням на значення бланку).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Practice Bulletins—Obstetrics. Practice Bulletin No. 171: Management of Preterm Labor. Obstet Gynecol. 2016 Oct;128(4):e155-64.

2. Liu, Li, et al. "Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000–15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals." The Lancet 388.10063 (2016): 3027-3035.

3. Di Renzo, Gian Carlo, et al. "Guidelines for the management of spontaneous preterm labor: identification of spontaneous preterm labor, diagnosis of preterm premature rupture of membranes, and preventive tools for preterm birth." The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine 24.5 (2011): 659-667.

4. Mittal, Pooja, et al. "528: A role for placental alpha-microglobulin-1 in the identification of women with a sonographic short cervix at risk for spontaneous rupture of membranes." American Journal of Obstetrics & Gynecology 201.6 (2009): S196-S197.

5. WHO. «Preterm birth», 19 Feb, 2018, https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth

6. Sen, Cihat. "Preterm labor and preterm birth." Journal of perinatal medicine 45.8 (2017): 911-913.

7. Liu, Li, et al. "Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000–15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals." The Lancet 388.10063 (2016): 3027-3035.

8. American College of Obstetricians and Gynecologists. "Practice bulletin No. 171: management of preterm labor." Obstetrics and gynecology 128.4 (2016): e155-e164.

9. Haas, Jennifer S., et al. "Prepregnancy health status and the risk of preterm delivery." Archives of pediatrics & adolescent medicine 159.1 (2005): 58-63.

10. Glover, Angelica V., and Tracy A. Manuck. "Screening for spontaneous preterm birth and resultant therapies to reduce neonatal morbidity and mortality: A review." Seminars in Fetal and Neonatal Medicine. Vol. 23. No. 2. WB Saunders, 2018.

11. Goldenberg, Robert L., Alice R. Goepfert, and Patrick S. Ramsey. "Biochemical markers for the prediction of preterm birth." American journal of obstetrics and gynecology 192.5 (2005): S36-S46.

12. Hendler, Israel, et al. "The Preterm Prediction Study: association between maternal body mass index and spontaneous and indicated preterm birth." American journal of obstetrics and gynecology 192.3 (2005): 882-886.

13. Jiang, Min, et al. "A case control study of risk factors and neonatal outcomes of preterm birth." Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology 57.6 (2018): 814-818.

14. Reilly, John J., et al. "Early life risk factors for obesity in childhood: cohort study." Bmj 330.7504 (2005): 1357.

15. Sasieni, Peter, et al. "Risk of preterm birth following treatment for cervical disease: Stakeholder meeting summary." Ultrasound in Obstetrics and Gynecology 123.9 (2016): 1426-1429.

16. Krupa, F. G., et al. "Predictors of preterm birth." International Journal of Gynecology & Obstetrics 94.1 (2006): 5-11.

17. Schumacher, Anne. "Human chorionic gonadotropin as a pivotal endocrine immune regulator initiating and preserving fetal tolerance." International journal of molecular sciences 18.10 (2017): 2166.

18. Gotsch, Francesca, et al. "The preterm parturition syndrome and its implications for understanding the biology, risk assessment, diagnosis, treatment and prevention of preterm birth." The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine 22.sup2 (2009): 5-23.

19. Phillips, Courtney, et al. "Risk of recurrent spontaneous preterm birth: a systematic review and meta-analysis." BMJ open 7.6 (2017).

20. Wong, Luchin F., et al. "Risk factors associated with preterm birth after a prior term delivery." BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology 123.11 (2016): 1772-1778.

21. Gimenez, Lucas G., et al. "Maternal and neonatal epidemiological features in clinical subtypes of preterm birth." The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine 29.19 (2016): 3153-3161.

22. Mercer, Brian M., et al. "The antibiotic treatment of PPROM study: systemic maternal and fetal markers and perinatal outcomes." American journal of obstetrics and gynecology 206.2 (2012): 145-e1.

23. Menon, Ramkumar, and Lauren S. Richardson. "Preterm prelabor rupture of the membranes: a disease of the fetal membranes." Seminars in perinatology. Vol. 41. No. 7. WB Saunders, 2017.

24. Menon, Ramkumar. "Spontaneous preterm birth, a clinical dilemma: etiologic, pathophysiologic and genetic heterogeneities and racial disparity." Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica 87.6 (2008): 590-600.

25. Shenoi, S., M. L. Shaffer, and C. A. Wallace. "Environmental Risk Factors and Early-Life Exposures in Juvenile Idiopathic Arthritis: A Case–Control Study." Arthritis care & research 68.8 (2016): 1186-1194.

26. Shapiro-Mendoza, Carrie K., et al. "CDC grand rounds: public health strategies to prevent preterm birth." Morbidity and Mortality Weekly Report 65.32 (2016): 826-830.

27. Hirai, Ashley H., et al. "The Collaborative Improvement and Innovation Network (CoIIN) to reduce infant mortality: an outcome evaluation from the US South, 2011 to 2014." American journal of public health 108.6 (2018): 815-821.

28. Міністерство охорони здоров'я України. Національні підходи о впровадження системи регіоналізації перинатальної допомоги в Україні (практичні настанови), 2012, http://www.reprohealth.info.

29. Міністерство охорони здоров'я України. «Про внесення змін до наказу МОЗ України від 15 грудня 2003 року N 582 "Про затвердження клінічних

протоколів з акушерської та гінекологічної допомоги", наказу МОЗ від 31.12.2004 року N 676 "Про затвердження клінічних протоколів з акушерської та гінекологічної допомоги.", 2008, https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0624282-08#Text

30. Schleußner, Ekkehard. "Drohende Frühgeburt: Prävention, Diagnostik und Therapie." gen 5 (2013): 7.

31. University Hospital, Clermont-Ferrand. «Diagnostic Tests in the Context of Threatened Preterm Labour (PREMAQUICK).», 29 Aug, 2018, https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03608995

32. Cobo, Teresa, et al. "Development and validation of a multivariable prediction model of spontaneous preterm delivery and microbial invasion of the amniotic cavity in women with preterm labor." American journal of obstetrics and gynecology 223.3 (2020): 421-e1.

33. Ananth, Cande V., et al. "Recurrence of spontaneous versus medically indicated preterm birth." American journal of obstetrics and gynecology 195.3 (2006): 643-650.

34. Jwala, Sushma, et al. "Evaluation of additive effect of quantitative fetal fibronectin to cervical length for prediction of spontaneous preterm birth among asymptomatic low-risk women." Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica 95.8 (2016): 948-955.

35. Berghella, Vincenzo, et al. "Cerclage for short cervix on ultrasonography in women with singleton gestations and previous preterm birth: a meta-analysis." Obstetrics & Gynecology 117.3 (2011): 663-671.

36. Dawes, Lisa K., et al. "The Biomarkers for Preterm Birth Study—A prospective observational study comparing the impact of vaginal biomarkers on clinical practice when used in women with symptoms of preterm labor." Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica 99.2 (2020): 249-258.

37. Oskovi Kaplan, Zeynep Asli, and A. Seval Ozgu-Erdinc. "Prediction of preterm birth: maternal characteristics, ultrasound markers, and biomarkers: an updated overview." Journal of pregnancy 2018 (2018).

38. Klebanoff, Mark A., et al. "Is bacterial vaginosis a stronger risk factor for preterm birth when it is diagnosed earlier in gestation?." American journal of obstetrics and gynecology 192.2 (2005): 470-477.

39. Honest, Honest, et al. "The accuracy of various tests for bacterial vaginosis in predicting preterm birth: a systematic review." BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology 111.5 (2004): 409-422.

40. van Baaren, G-J., et al. "Cost-effectiveness of diagnostic testing strategies including cervical-length measurement and fibronectin testing in women with symptoms of preterm labor." Ultrasound in Obstetrics & Gynecology 51.5 (2018): 596-603.

41. Bolt, Lauren A., et al. "The value of combined cervical length measurement and fetal fibronectin testing to predict spontaneous preterm birth in asymptomatic high-risk women." The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine 24.7 (2011): 928-932.

42. Yost, Nicole P., et al. "Second-trimester cervical sonography: features other than cervical length to predict spontaneous preterm birth." Obstetrics & Gynecology 103.3 (2004): 457-462.

43. Echebiri, Nelson C., et al. "Placental alpha-microglobulin-1 and combined traditional diagnostic test: a cost-benefit analysis." American journal of obstetrics and gynecology 212.1 (2015): 77-e1.

44. Mariona, Federico G., and Lluis Cabero Roura. "The role of placental alpha microglobulin-1 amnisure in determining the status of the fetal membranes; its association with preterm birth. Traditions… traditions…." The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine 29.6 (2016): 1016-1020.

45. Boltovskaia, M. N., et al. "Histochemical and clinical-diagnostic study of placental alpha 1-microglobulin using monoclonal antibodies." Biulleten'eksperimental'noi biologii i meditsiny 112.10 (1991): 397-400.

46. Cousins, Larry M., et al. "AmniSure placental alpha microglobulin-1 rapid immunoassay versus standard diagnostic methods for detection of rupture of membranes." American journal of perinatology 22.06 (2005): 317-320.

47. Sosa, Claudio G., et al. "Comparison of placental alpha microglobulin-1 in vaginal fluid with intra-amniotic injection of indigo carmine for the diagnosis of rupture of membranes." Journal of perinatal medicine 42.5 (2014): 611-616.

48. Lee, Seung Mi, et al. "The clinical significance of a positive Amnisure test™ in women with term labor with intact membranes." The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine 22.4 (2009): 305-310

49. Fuks, Boris, et al. "Devices and methods for detecting amniotic fluid in vaginal secretions." U.S. Patent No. 8,114,610. 14 Feb. 2012

50. Laemmli, Ulrich K. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." nature 227.5259 (1970): 680-685.

51. Ó'Fágáin, Ciarán, Philip M. Cummins, and Brendan F. O'Connor. "Gel-filtration chromatography." Protein Chromatography (2011): 25-33.

52. Fekete, Szabolcs, et al. "Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates." Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 101 (2014): 161-173.

53. Doret, Muriel, et al. "Premature preterm rupture of the membrane diagnosis in early pregnancy: PAMG-1 and IGFBP-1 detection in amniotic fluid with biochemical tests." Clinical biochemistry 46.18 (2013): 1816-1819.

54. Kurien, Biji T., Rachna Aggarwal, and R. Hal Scofield. "Protein extraction from gels: A brief review." Electrophoretic Separation of Proteins (2019): 479-482.

55. Gallot, D. "Diagnostic de la rupture des membranes. RPC Rupture prématurée des membranes avant terme CNGOF." Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie 46.12 (2018): 1022-1028.

56. Giagen. «Maternal/Fetal Testing.», 2021, https://www.qiagen.com/us/products/diagnostics-and-clinical-research/sexual-reproductive-health/maternal-fetal-testing/amnisure-rom-test-10-min-us/.

57. Çekmez, Yasemin, et al. "Use of cervicovaginal PAMG-1 protein as a predictor of delivery within seven days in pregnancies at risk of premature birth." BMC pregnancy and childbirth 17.1 (2017): 1-5.

58. Melchor, J. C., et al. "Prediction of preterm delivery in symptomatic women using placental alpha-microglobulin-1, fetal fibronectin and phosphorylated insulin-like growth factor-binding protein-1 tests: systematic review and meta-analysis stratified by risk." Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology (2018).

59. Abdelazim, Ibrahim A., and Hanan H. Makhlouf. "Placental alpha microglobulin-1 (AmniSure® test) for detection of premature rupture of fetal membranes." Archives of gynecology and obstetrics 285.4 (2012): 985-989.

60. Liversedge, Nigel. "Three biomarker tests to help diagnose preterm labour: a systematic review and economic evaluation." (2019).

ДОДАТКИ

Додаток А. Характеристика стану шийки матки та розташування плоду щодо наявності чи відсутності передчасних пологів.

Період	**Фаза**	
Шийка не розкрита	Хибні пологи /відсутність пологової діяльності/	
Шийка розкрита менше, ніж на 3 см	Перший	Латентна
Шийка розкрита на 3-9 см. Швидкість розкриття шийки матки не менше (або більше) – 1 см/год. Початок опускання голівки плода	Перший	Активна
Повне розкриття шийки матки (10 см). Голівка плода у порожнині тазу. Немає позивів до потуг	Другий	Рання
Повне розкриття шийки (10 см). Передлегла частина плода досягає дна тазу. Роділля починає тужитись	Другий	Пізня (потужна)

Третій період пологів починається з моменту народження дитини і закінчується вигнанням посліду	Третій	

Додаток Б. Титр антитіл в сироватці імунізованого кролика на різних днях забору крові після останньої ін'єкції циклу імунізації (білком PAMG-1) у двох повторностях з поправкою на бланк.

	Оптична густина антитіл в ІФА					
Розведення сироваток	**7 день**		**14 день**		**21 день**	
	№1	№2	№1	№2	№1	№2
Blank	0,269		0,379		0,379	
1:500	0,889	0,757	0,854	0,901	1,047	1,075
1:1000	0,725	0,599	0,677	0,719	0,867	0,944