

①



LATVIJAS REPUBLIKAS
PATENTU VALDE

① LV 15133 B

⑤ Int.Cl G01N33/53
G01N33/543

Latvijas patents uz izgudrojumu
2007.g. 15.februāra Latvijas Republikas likums

②

Īsziņas

②①	Pieteikuma numurs:	P-16-14	⑦③	Īpašnieks(i): RĪGAS STRADIŅA UNIVERSITĀTE, Dzirciema iela 16, Rīga LV-1007, LV
②②	Pieteikuma datums:	09.03.2016	⑦②	Izgudrotājs(i): Jeļena EGLĪTE (LV), Diāna KASJKO (LV), Vladislavs JASINSKIS (LV), Elvīra HAGINA (LV), Inga JANUŠKEVIČA (LV), Gunta STŪRE (LV), Baiba ROZENTĀLE (LV), Jeļena STOROŽENKO (LV), Ludmila VĪKSNA (LV)
④①	Pieteikuma publikācijas datums:	20.06.2016	⑦④	Pilnvarotais vai pārstāvis: Ludmila IVANOVA, Dzirciema iela 16, Rīga LV-1007, LV
④⑤	Patenta publikācijas datums:	20.01.2017		
③①	Prioritāte:			

⑤④ Virsraksts: **AR HIV INFIČĒTAS MĀTES INTRAUTERĪNAS AUGĻA HIV INFIČĒŠANĀS
PROGNOZĒŠANAS PAŅĒMIENS PIRMAJOS SEŠOS GRŪTNIECĪBAS MĒNEŠOS**

⑤⑦ Kopsavilkums: Izgudrojums attiecas uz medicīnu, konkrēti uz infekcijas slimībām un molekulāri-ģenētiskiem pētījumiem, īpaši uz augļa HIV inficēšanās riska prognozēšanu grūtniecības pirmajos sešos mēnešos. Tiek piedāvāta metode, kurā mātes asins leikocītos tiek noteiktas TNFQ α , IL2, IL4, IL12 β , IL10, INF γ mutācijas, bet mātes asins serumā nosaka interleikīnu IL2, IL12 daudzumu.

IZGUDROJUMA APRAKSTS

Izgudrojums attiecas uz medicīnu, konkrēti uz infekcijas slimībām un molekulāri-ģenētiskiem pētījumiem, un ir izmantojams, lai prognozētu ar HIV inficētas mātes intrauterīnu augļa HIV inficēšanos pirmajos sešos grūtniecības mēnešos.

TEHNIKAS LĪMENIS

Saskaņā ar Pasaules Veselības organizācijas (PVO) datiem pasaulē reģistrēti 40 miljoni ar HIV inficētu cilvēku, puse no šī kopējā skaita ir sievietes reproduktīvā vecumā. Ir zināms vertikālais ceļš HIV infekcijas pārvešanai no grūtnieces auglim. Ar HIV inficētai grūtniecei, neveicot profilaktiskas darbības un atbilstošu ārstēšanu, bērns 30 % gadījumos var būt inficēts ar HIV. HIV infekcija bērnības periodā raksturīga ar nelabvēlīgu norisi, ātru iegūtā imūndeficīta (AIDS) klīnisko sindromu un augstu letalitāti. Bērniem HIV infekcija, kas iegūta no HIV inficētas mātes, 30 % gadījumos noris ātrā gaitā, pēc kuras AIDS attīstās līdz divu gadu vecumam ar letālu iznākumu dzīves pirmajos piecos gados [1].

Pētot predispozīciju (noslieci) un risku saslimt ar dažādām slimībām, konkrēti, ar infekcijas slimībām, īpaša uzmanība tiek veltīta ģenētiskā līmeņa mehānismiem. Atsevišķu nukleotīdu (*single-nukleotide*, angl.) polimorfu struktūras izmaiņu ģenētiskā testēšana – predispozīcijas (noslieces) gēnu mutāciju testēšana ļauj noteikt riska grupas, kurām ir nosliece uz slimībām. Molekulārā testēšana atklāj izmaiņas gēnu lokusā, atsevišķu nukleotīdu polimorfisms struktūrā nosaka konkrētas gēna daļas mutāciju, kura nosaka konkrētās funkcijas kodēšanu. Lai noteiktu gēna lokusa mutāciju, izmanto polimerāzes ķēdes reakciju PQR (PCR, angl.), praimeru paneļus un automātisko sekvenēšanu. PQR molekulārās bioloģijas eksperimentālā metode ļauj panākt ievērojamu DNS mazu fragmentu pieaugumu (amplifikācija) bioloģiskajā materiālā. PQR specifiskums pamatojas uz DNS matricas un praimeru komplementāro kompleksu veidošanos – īsu sintētisku oligonukleotīdu veidošanos, kuru garums ir 18–30 nukleotīdi. Katrs praimeris norobežo amplificētās DNS daļas sākumu un beigas. Mutāciju atklāšana notiek DNS sekvenēšanas procesā, kurā izmanto specifiskus nukleotīdus, kuri iezīmēti ar fluorescentu atzīmi vai ar

radioaktīvo izotopu. PĶR (PCR) gaitā DNS ķēdē iekļaujas iezīmētie specifiskie nukleotīdi, kas izraisa sintēzes pārrāvumu, pēc tam poliakrilamīda gelā tiek sadalītas DNS ķēdes un tiek noteikts specifisko nukleotīdu stāvoklis, to mutācija. Sekvenēšana (*sequence*-secība, angl.) – nukleotīdu secības atšifrēšanas metode, kur notiek ģenētiskā materiāla pārnese uz automātisko elektronisko fāzi, aprēķinot fluoroforu emisijas spektru sekvenatorā. Rezultāti tiek atspoguļoti datorā, tiek sastādītas ģenētiskās kontroles programmas un paneļi, kurus izmanto saslimšanas attīstības riska prognozēšanai. Mērot nelielu daudzumu DNS, reālā laika PĶR (PCR) – kPĶR (qPCR) kombinē kopā ar apgrieztās transkripcijas reakciju AT–kPĶR (PT– qPCR, *reverse transcription* PCR, PT– qPCR).

Ir zināms, ka sistēmisku saslimšanu patoloģijas pazīmēm piemīt noteiktas etniskas īpatnības. Dažādām etniskām populācijām ir dažādas gēna alēles, t.i., dažādas viena gēna formas. Turklāt dažādās alēles nosaka dažādus attīstības variantus viena un tā paša gēna pazīmei, kas kodē konkrētu funkciju. Dažādās alēles dažādās etniskās populācijās asociējas ar patoloģijas attīstības risku, zināmas dažādas riska alēles jeb riska marķieri. PĶR specifiskums atkarīgs no izmantojamo gēnu specifisko praimeru izvēles, kuri imitē infekcijas ierosinātāja dažādo alēļu sekvences dažādās etniskās populācijās [2–10]. Lai pētītu noteikta gēna (DNS mutācijas daļu izpēte) DNS ekspresiju, izmanto gēnu specifiskos praimerus. K-DNS kvantitatīvai mērīšanai izmanto divus paņēmienus: *fluorescentos krāsotājus*, kuri ieslēdzas divķēžu DNS molekulā, un modificētus oligonukleotīdus (*DNS zondes*), kuri fluoriscē pēc hibridizācijas ar DNS komplementārajiem iecirkņiem [10-12].

Mehānismi ģenētiskajā līmenī ir tieši saistīti ar imunitātes šūnu reakcijām. Saskaņā ar hipotēzi par divu tipu imūnas atbildes esamību, šūnu imūno atbildi nodrošina helperu T-limfocītu Th1 apakšklase, kas producē proiekaisuma citokīnus – iekaisuma mediatorus. Humorālo imūno atbildi nodrošina Th2 – pretiekaisuma citokīni. Abi imūnās atbildes tipi nosaka dažādus imunitātes šūnu reakcijas tipus. Starpšūnu mijiedarbībā piedalās vairākas citokīnu saimes. Citokīnu disbalanss sekmē T-limfocītu *CD4+šūnu* infekciozo bojājumu, ko izraisa HIV, un imūnsupresijas rašanos. HIV vīruss iekļūst T-limfocītu *CD4+šūnās*, integrējas to ģenētiskajā aparātā un var saglabāties neaktīvā stāvoklī visas dzīves laikā. Vīrusam aktivizējoties, inficētajā šūnā sākas vīrusa jauno daļiņu strauja veidošanās, šūna izjūk, notiek jaunu T-šūnu inficēšana. Tomēr, regulāri lietojot medikamentus, cilvēks praktiski ir vesels. Citokīnu disbalansam ir svarīga nozīme, tas var veicināt imūnsupresijas rašanos.

Citokīnu gēniem piemīt augsta polimorfisma pakāpe. Citokīnu kā biomarkieru, ģenētiskā testēšana ļauj atklāt uzņēmību pret slimību un prognozēt patoloģijas attīstības risku. Svarīgākie ir IL6, TGFβ, IL1, IL2, IL4, IL15, IL12β, IL10, INFγ saimes citokīni [13-15].

Fizioloģiskas grūtniecības etapos olšūnas nobriešanu (placentas adhēzija, implantācija, formēšana un augšana) regulē endokrīnā un imūnā sistēma. Šie procesi paredz aktīvu šūnu mijiedarbību ar proiekaisuma un pretiekaisuma citokīnu piedalīšanos.

Lai noteiktu citokīnu kā biomarkieru saturu asins serumā, ir izstrādāts divkāršu antivielu paņēmieni pēc *xMAP* tehnoloģijas "sendvič"-varianta cietās fāzes imūnfermentā multikompleksā analīze LUMINEX. Biomarkieru imūnfermentās multikompleksās analīzes veikšanā izmanto mikrosfēras un reaģentus *Multiplex MAP Human Cytokine* – LUMINEX CORPORATION, ASV [16-18]. Veicot biomarkieru imūnfermento multiplekso reakciju, veic magnētisku mikrosfēru 45 minūšu inkubāciju ar pētāmo asins serumu, mazgā ar magnētiskās separācijas palīdzību, atdalot ar mikrosfērām nesavienotos komponentus. Iegūto "analīts-mikrosfēras" kompleksu inkubē 15 minūtes ar detektoru antivielām, no jauna mazgā. Iegūtam "sendvičam" pievieno fluorescento krāsvielu – konjugātu "biotīns-streptavidīns". Kā standartu katras reakcijas salīdzināšanai izmanto rekombinantus citokīnus, kas ietverti testa komplektos. Citokīnu detekciju veic, izmantojot imūnfermentu analizatoru LUMINEX-200. Citokīnu satura ciparu apstrādei izmanto LUMINEX-200 v2.3. programnodrošinājumu, saskaņā ar ražotāja LUMINEX CORPORATION, ASV rekomendācijām [16-18].

Zināms divpadsmitpirkstu zarnas čūlas attīstības riska prognozēšanas paņēmieni Hakasijas eiropiešiem, kas pamatojas uz citokīnu gēnu polimorfisma molekulāri-ģenētisko testēšanu: 1) C+3953 gēna IL-β; 2) IL-1Ra VNTR [8].

Zināma citokīna TNFα-308 gēna polimorfisma izpēte pacientiem ar C hepatītu. Atklāts, ka citokīna TNFα-308 gēna polimorfisms šiem slimniekiem saistīts ar noslieci uz aknu cirozes rašanās risku [9].

Izpētīta divu citokīnu gēnu polimorfismu asociācija: 1) audzēja nekrozes faktors FNOα-308 (TNFα- 308);2) interleikīns IL-6-174 (IL-6-174). Atklāts, ka citokīnu TNFα-308 un IL-6-174 gēnu polimorfisms saistīts ar noslieci uz vidusauss iekaisumu [10].

Ir zināms augļa intrauterīnās attīstības traucējumu noteikšanas paņēmieni, atklājot defektus citokīnu gēnu polimorfismā, kas var novest pie augļa letalitātes [15].

Ir zināms sievietes HIV inficēšanas iespējas prognozēšanas paņēmieni, kas balstās uz citokīnu gēnu molekulāri-ģenētisko testēšanu [11].

Nav zināms ar HIV inficētas sievietes intrauterīnas augļa inficēšanās iespējas prognozēšanas paņēmieni pirmajos sešos grūtniecības mēnešos.

Izgdrojuma mērķis ir ar HIV inficētas mātes intrauterīnas augļa inficēšanās prognozēšanas paņēmiena pirmajos sešos grūtniecības mēnešos izstrāde.

Mērķis tiek sasniegts tādējādi, ka mātes asins leukocītos nosaka citokīnu TNF α , IL2, IL4, IL12 β , IL10, INF γ mutācijas, mātes asins serumā nosaka interleikīnu IL2, IL12 daudzumu un, ja citokīnos konstatē 12 mutācijas TNF α -238, TNF α -308, IL2-330, IL2+166, IL4-33, IL4-1098, IL4-590, IL12 β -1188, IL10-592, IL10-819, IL10-1082, INF γ +874, turklāt IL2 saturs asins serumā ir 14 pg/ml un mazāk, bet IL12 saturs ir 74 pg/ml un mazāks, tad prognozē intrauterīnu augļa inficēšanos ar HIV. Turklāt no leukocītiem izdala DNS, veic tās pilna genoma sekvenēšanu, ar apgriestās transkripcijas metodi (RT PCR) veic DNS amplifikāciju, nosaka atsevišķu nukleotīdu izmaiņas citokīnu gēnu struktūrā (polimorfisms), un kā gēnu specifiskus praimerus izmanto Oligo: IL2F60, 9/263(110-300); IL2R44/260(110-300); IL4F60.9/176(-30-1200); IL4R80/255(-30-1200); IL12 β F32.1/251(-990-1208); IL12 β R52.4/151(-990-1208); TNF α F50.0/238(234-450); TNF α R52.6/237(234-450); IL10F65.0/269(-520-1210); IL10R68.7/290(-520-1210); INF γ F65.0/262(-790-910); IFN γ R66.0270(-790-910). Interleikīnu IL2 un IL12 saturu asins serumā nosaka ar divkāršu antivielu palīdzību pēc xMAP tehnoloģijas "sendvič"-varianta cietās fāzes imūnfermentu multikompleksās analīzes LUMINEX.

22 grūtniecēm, kurām bija HIV inficēšanās risks, tika veikts pētījums Latvijas Infektoloģijas centrā laikā no 2012. gada līdz 2015. gadam. Sieviešu vidējais vecums bija 26 \pm 4 gadi. Visām 22 grūtniecēm veica izmeklēšanu saskaņā ar HIV inficēšanās riska iespējas noteikšanas paņēmieni sievietēm, proti, pētīja 12 mutāciju TNF α -238, TNF α -308, IL2-330, IL2+166, IL4-33, IL4-1098, IL4-590, IL12 β -1188, IL10-592, IL10-819, IL10-1082, INF γ +874 klātbūtni citokīnu TNF α , IL2, IL4, IL12 β , IL10, INF γ gēnos [11].

Visām 22 grūtniecēm no asins leukocītiem izdalīja DNS, izmantojot *QIAamp DNA*: 1,5 ml mēģenē ar vāciņu ar stobriņu pārnesa 20 μ l proteāzes. Mēģenē ar proteāzi pievienoja 200 μ l asiņu, ko pēc tam ar stobriņu samaisīja. Pievienoja 200 μ l

bufera AL, maisīja centrifūgā 15 sekundes un pēc tam inkubēja 10 minūtes termostatā 56 °C temperatūrā. Pēc izņemšanas no termostata centrifugēja 3-5 sekundes ar 3000 apgr./min., lai noņemtu pilienus no mēģenes vāciņa. Pievienoja 200 µl 96–100 % metanola, aizvēra vāciņu, ar rokas kustību, lēnām, maisīja mēģenes saturu, un pēc tam ievietoja centrifūgā, kur to maisīja 15 sekundes, lai noņemtu pilienus no mēģenes vāciņa. Uzmanīgi, nepieskaroties *QIAamp micro spin* riņķim, ar stobriņu pārnesa mēģenes saturu. *QIAamp micro spin* bija jābūt ievietotai 2 ml mēģenē. Inkubēja 1 minūti istabas temperatūrā. Ar vāciņu noslēgtu mēģeni centrifugēja 1 minūti ar 6 000–8 000 apgr./min. Pēc izņemšanas no centrifūgas mēģeni ar virsnogulšņu šķidrumu (atrodas apakšā) nomainīja pret jaunu. *QIAamp micro spin* atstāja, tajā atradās nepieciešamās nogulsnes (DNS). Uzmanīgi, nepieskaroties *QIAamp micro spin* riņķim, pievienoja 500 µl bufera AW1, inkubēja 1 minūti istabas temperatūrā, pēc tam centrifugēja 1 minūti ar 6 000–8 000 apgr./min. Mēģeni ar virsnogulšņu šķidrumu (atrodas apakšā) nomainīja pret jaunu. *QIAamp micro spin* mēģenē uzmanīgi, nepieskaroties riņķim, pievienoja 500 µl bufera AW2, inkubēja 1 minūti istabas temperatūrā, centrifugēja 3 minūtes ar 14 000–20 000 apgr./min. Nomainīja jaunu 1,5 ml mēģeni (*QIAamp micro spin* mēģene visu laiku saglabājās tā pati, tajā atradās nepieciešamās DNS nogulsnes). Uzmanīgi, nepieskaroties *QIAamp micro spin* riņķim, pievienoja 200 µl bufera AE vai destilētu ūdeni, inkubēja 5 minūtes 15–20 °C temperatūrā, pēc tam centrifugēja 1 minūti ar 6 000–8 000 apgr./min. DNS kvalitāte un kvantitāte tika pārbaudīta, izmantojot *Qubit® fluorometer (Invitrogen ASV)* [19-21].

Lai izmērītu nelielu daudzumu DNS, kombinēja polimerāzes ķēdes reakciju (PKR, PCR – angl.) kopā ar apgrieztās transkripcijas reakciju (AT–kPKR, *reverse transcription* PCR, RT–PCR, angl.). Apgrieztās transkripcijas reakcijas veikšanai bija nepieciešams izmantot gēnu specifiskos praimerus, kas ekspresēja konkrētu gēnu.

Lai identificētu gēnu – specifisko praimeru sastāvu, veicot apgrieztās transkripcijas AT–kPKR reakcijas monitoringu (*reverse transcription* PCR, RT–PCR, angl.), tika veikta 12 iegūto mutāciju ģenētisko sekvenču salīdzināšana ar ASV Nacionālā Biotehnoloģijas Informācijas Centra (NCBI) ģenētisko sekvenču datu bāzi [28,29]. Salīdzināšanas procesā tika noteikts šāds 24 gēnu specifisko praimeru sastāvs:

	OligoIL2F60.9/263(-330);	OligoIL2R44/260(-330);
OligoIL2F61.9/260(+166);	OligoIL2R47/251(+166);	OligoIL4F60.9/176(-33);
OligoIL4R80/255(-33);	OligoIL4F60.8/256(-1098);	OligoIL4R66/255(-1098);

OligoIL4F60.0/256(-590); OligoIL4R66.2/250(-590); OligoIL12BF32.1/251(-1208); OligoIL12BR52.4/151(-1208); OligoTNF α F50.0/238(-238); OligoTNF α R52.6/237(-238); OligoTNF α F60.0/248(-308); OligoTNF α R66.7/239(-308); OligoIL10F65.0/269(-592); OligoIL10R68.7/290(-592); OligoIL10F65.2/239(-819); OligoIL10R68.0/260(-819); OligoIL10F65.0/269(-1082); OligoIL10R68.7/290(-1082); OligoIFN- γ F65.0/262(-874); OligoIFN γ R66.0/270(-874), kas saīsinātā veidā uzrādīti kā 12 gēnu specifiskie praimeru Oligo: IL2F60.9/263(110-300); IL2R44/260(110-300); IL4F60.9/176(-30-1200); IL4R80/255(-30-1200); IL12BF32.1/251(-990-1208); IL12BR52.4/151(-990-1208); TNF α F50.0/238(234-450); TNF α R52.6/237(234-450); IL10F65.0/269(-520-1210); IL10R68.7/290(-520-1210); IFN- γ F65.0/262(-790-910); IFN- γ R66.0/270(-790-910).

Ar sekvenēšanas palīdzību noteica nukleotīdu sekvences katram no 6 citokīnu gēniem: IL-12 β , IL-10, IL-2, IL-4, IFN- γ un TNF [22]. Citokīnu gēnu DNS struktūras ģenētisko analīzi noteica ar automātiskās sekvenēšanas metodi, izmantojot ģenētisko analizatoru *ABI PRISM 310* (firma "Applied Biosystems", ASV) [23]. Pētījuma gaitā tika izmantots reakcijas maisījums *BigDye[®] Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit* [24]. Iegūto rezultātu analīze tika veikta, izmantojot programmnodrošinājumu *ABI PRISM[®] Sequencing Analysis Software or ABI PRISM[®] GeneScan[®]* [23,24]. Amplikonu attīrīšanai un sagatavošanai turpmākiem pētījumiem izmantoja *GeneJet PCR Purification Kit (Fermentas, Lietuva)* kopumu [25].

Iegūto paraugu identifikācija tika veikta ar programmas *BLAST* palīdzību, izmantojot ASV Nacionālā Biotehnoloģijas Informācijas Centra (*National Center for Biotechnological Information, NCBI*) datu bāzi, pamatojoties uz iegūto nukleotīdu sekvenču analīzi, kura tika veikta katram paraugam [26,27].

Identificēto genotipu biežuma novērtēšanu veica pēc kritērija – χ^2 -kvadrāts, salīdzinot ar paredzamo genotipu biežuma sadalījumu. Statistisko kļūdu alēļu biežuma sadalījumā aprēķināja pēc formulas $sp = \sqrt{p(1-p)/2N}$, kur p – alēles biežums; N – indivīdu skaits paraugā.

Divu grupu salīdzināšanai pēc skaitliskām pazīmēm izmantoja Manna–Vitnija *U-kritēriju*. Pieņēma, ka dažādas grupas ir statistiski ticamas, ja $p < 0,05$. Iegūto rezultātu apstrāde tika veikta, izmantojot programmatūras paketi *StatSoft Statistica 6.0* [28,29].

Tika izdalīti 6 citokīnu gēnu polimorfi, kas saistīti ar atsevišķa nukleotīda aizstāšanu, kas asociējas ar abu grupu sievietēm. Tika iegūtas apmēram 306 citokīnu

gēnu mutācijas. 11 no 22 grūtniecēm tika atklātas 12 mutācijas 6 citokīnu gēnos, kuru polimorfu sastopamība bija 5 reizes un vairāk, konkrēti: TNF α -238; TNF- α -308; IL2 -330; IL2 +166; IL4 -33; IL4-1098; IL4 -590; IL12 β -1188; IL10 -592; IL10 -819; IL10 -1082; IFN- γ + 874 (12 mutācijas).

Citām 11 no 22 grūtniecēm nebija atklātas 6 citokīnu gēnu 12 mutācijas. Šīm 11 sievietēm grūtniecība noritēja normāli, un jaundzimušajiem nebija HIV patoloģisko izmaiņu. Tām 11 no 22 sievietēm, kurām tika atklātas citokīnu gēnu 12 mutācijas leukocītos, tika noteikta HIV pirmā stadija. Diagnozes apstiprināšanai izmantoja Eiropas Savienībā pielietojamas standarta metodes [19-21]. Minētās grūtnieces tika brīdinātas par gēnu izmaiņām leukocītos, kas var veicināt iespējamu inficēšanu ar HIV. Šīm 11 grūtniecēm tika veikta savlaicīga profilakse un antivīrusu terapija AVT, lai novērstu HIV vīrusa reakciju ar augstu vīrusu slodzi asinīs (VSA HIV), un lai novērstu imūno CD4+šūnu limfocītu aktivitātes samazināšanos asinīs. Antivīrusu terapija tika nozīmēta grūtniecības laikā, dzemdību laikā un pēc dzemdībām. Specifisko HIV infekcijas ķīmisko profilaksi veica trīs etapos, saskaņā ar protokolu. Ķīmiskās terapijas efektivitāti raksturoja vīrusa koncentrācijas maksimālā nomākšana asinīs.

Citokīnu daudzuma disbalanss var izraisīt imūnsupresiju [13-15]. Lai izpētītu imūnsupresijas stāvokli tām 11 HIV inficētajām sievietēm, kurām tika atklātas citokīnu gēnu 12 mutācijas leukocītos, veica 9 asins seruma citokīnu satura izpēti. 9 citokīnu saturu salīdzināja grūtniecības pirmajos sešos mēnešos (4., 12. un 24. nedēļā). 9 citokīnu IFN γ , TGF β , IL1, IL2, IL4, IL6, IL10, IL12, IL15 daudzuma noteikšanai sieviešu asins serumā tika izmantots divkāršu antivielu paņēmieni pēc xMAP tehnoloģijas "sendvič"-variānta cietās fāzes imūnfermentu multikompleksās analīzes LUMINEX [16-18]. Veicot pētījumus, sievietēm ņēma venozās asinis un ievietoja tās centrifūgā, centrifugējot atdalīja no asinīm serumu. Asins serumā noteica 9 citokīnu daudzumu. Citokīnu daudzuma statistisko apstrādi veica, izmantojot lietojumprogrammu "Statgraphics 2.1", aprēķinot vidējo (M) un standarta novirzi (S). Divu paraugu ņemšanas atšķirību ticamību novērtēja, izmantojot C² kritēriju. Kā statistiski ticamas uzskatīja atšķirības starp grupām, ja nozīmīguma līmenis $p < 0,05$.

Veicot citokīnu daudzuma izpēti asins serumā 11 HIV inficētām grūtniecēm, noteica divas likumsakarības: pirmajai sieviešu grupai (5 grūtniecēm) tika konstatēta interleikīnu IL2 (14pg/ml un mazāk) un IL12 (74 pg/ml un mazāk) daudzuma samazināšanās, un jaundzimušajiem parādījās dažādi ar HIV vīrusu inficēšanos saistīti

klīniskie simptomi. Otrai sieviešu grupai (6 grūtniecēm) interleikīnu IL2 (15 pg/ml un vairāk) un IL12 (75 pg/ml un vairāk) daudzums bija normāls. Sešām grūtniecēm ar normālu interleikīnu daudzumu jaundzimušajiem nebija klīnisko simptomu, kas raksturīgi HIV infekcijai.

Izpētes rezultāti par interleikīnu IL2 un IL12 daudzumu asins serumā 11 HIV inficētām grūtniecēm, kurām tika konstatētas 12 mutācijas citokīnu gēnos, ir atspoguļoti divās tabulās.

1. tabula

Pacienta Nr.p.k.	4. nedēļa		12. nedēļa		24. nedēļa	
	IL2, pg/ml	IL12, pg/ml	IL2, pg/ml	IL12, pg/ml	IL2, pg/ml	IL12, pg/ml
1.	4.76	54.8	5.66	58.7	4.10	52.50
2.	8.29	61.2	7.08	65.8	6.11	53.4
3.	8.22	55.3	6.11	74.0	6.10	52.9
4.	9.14	59.1	5.18	61.0	5.16	42.6
5.	14.01	42.3	7.05	40.4	7.05	51.9

Pirmajā tabulā attēloti rezultāti par interleikīnu IL2 un IL12 daudzumu asins serumā tām 5 HIV inficētajām grūtniecēm (pirmā grupa), kuru jaundzimušajiem daļēji parādījās ar HIV saistīti klīniskie simptomi. Katru interleikīnu izpēti veica 3-7 reizes.

Kā var secināt no izpētes rezultātiem 1. tabulā, IL2 daudzums asins serumā pirmās grupas sievietēm pirmajos sešos grūtniecības mēnešos ir 14 pg/ml un mazāk, $p < 0,001$, kas ir 2,9 reizes mazāk par normu (15 pg/ml un vairāk). IL12 daudzums asins serumā pirmās grupas sievietēm pirmajos sešos grūtniecības mēnešos ir 74 pg/ml un mazāk, $p < 0,001$, kas ir 1,3 reizes mazāk par normu (75 pg/ml un vairāk).

2. tabula

Pacienta Nr.p.k.	4. nedēļa		12. nedēļa		24. nedēļa	
	IL2, pg/ml	IL12, pg/ml	IL2, pg/ml	IL12, pg/ml	IL2, pg/ml	IL12, pg/ml
6.	66.2	81.8	47.1	80.3	57.3	115.0
7.	61.2	82.5	49.9	75.5	58.0	86.6
8.	55.2	76.1	15.5	81.5	57.1	84.9
9.	63.4	85.1	45.6	80.4	56.1	84.9
10.	53.2	84.6	47.5	80.9	57.1	84.8
11.	68.3	88.2	48.1	80.9	58.1	85.6

Otrajā tabulā attēloti rezultāti par interleikīnu IL2 un IL12 daudzumu asins serumā tām 6 HIV inficētām grūtniecēm (otrā grupa), kuru jaundzimušajiem nebija HIV infekcijas klīnisko izpausmju. Katru interleikīnu izpēti veica 4-8 reizes.

Kā var secināt no izpētes rezultātiem 2. tabulā, IL2 daudzums asins serumā sešām HIV inficētām grūtniecēm no otrās grupas ir 15 pg/ml un vairāk, $p < 0,001$. IL12 daudzums asins serumā sešām HIV inficētām grūtniecēm no otrās grupas ir 75 pg/ml un vairāk, $p < 0,001$.

Izpētes procesā piecām no vienpadsmit ar HIV inficētām grūtniecēm tika iegūti statistiski ticami dati par ievērojamu divu no deviņiem citokīnu daudzuma samazināšanos asins serumā, proti interleikīns IL2 bija 14 pg/ml un mazāk, bet interleikīns IL12 bija 74 pg/ml un mazāk. Šīm piecām grūtniecēm, kurām bija noteikta IL2 un IL12 daudzuma samazināšanās, jaundzimušajiem vēlāk daļēji parādījās ar HIV vīrusu inficēšanos saistīti klīniskie simptomi. Sešām no vienpadsmit HIV inficētām grūtniecēm interleikīnu IL2 un IL12 daudzums bija normāls, proti IL2 bija 15 pg/ml un vairāk, IL12 bija 75 pg/ml un vairāk. Šīm sešām HIV inficētām grūtniecēm jaundzimušajiem nebija ar HIV inficēšanos saistīto klīnisko simptomu. Tādējādi, pēc konkrētās interleikīnu IL2 un IL12 daudzuma samazināšanās ar HIV inficēto grūtnieču asins serumā var prognozēt intrauterīnu augļa HIV inficēšanos pirmajos sešos grūtniecības mēnešos. No HIV inficētās mātes intrauterīnu augļa inficēšanās prognozēšana kļuva iespējama tām HIV inficētām grūtniecēm, kurām HIV inficēšanās diagnoze bija noteikta, nosakot divpadsmit mutācijas sešos citokīnu gēnos leukocītos.

Veiktie interleikīnu līmeņa izmaiņu pētījumi ar HIV vīrusu apgrūtinātas grūtniecības laikā parādīja, ka interleikīni IL2 un IL12 var kalpot kā marķieri HIV inficētās mātes intrauterīnas augļa HIV inficēšanās riska atklāšanai. Interleikīna IL2 saturs intrauterīnas augļa inficēšanās draudu gadījumā ticami samazinājās 2,9 reizes salīdzinājumā ar analogiskiem rādītājiem, ja grūtniecība norit bez sarežģījumiem ($p < 0,001$). IL12 līmenis samazinājās 1,3 reizes salīdzinājumā ar grūtniecību bez sarežģījumiem.

Visām vienpadsmit HIV inficētām grūtniecēm, kurām tika konstatētas 12 mutācijas citokīnu gēnos leukocītos, tika nozīmēta antiretrovīrusu (ARV) terapija no 12. grūtniecības nedēļas. Aktīvā ķīmijas terapija tika uzsākta, lai samazinātu vīrusu daudzumu asinīs (VNR) un lai novērstu imūno T-limfocītu CD4+šūnu aktīvu

samazināšanos. VNR kontrolrādītāji ir ne vairāk kā 30 000 HIV kopiju vienā ml plazmas, T-limfocītu CD4+šūnu – ne mazāk kā 200 vienā mm³.

Piecām HIV inficētām grūtniecēm tika veikts plānots ķeizargrieziens 38.-39. grūtniecības nedēļā. Neraugoties uz ARV terapiju, četriem no pieciem jaundzimušajiem daļēji tika novēroti ar HIV inficēšanos saistīti klīniskie simptomi: mazs ķermeņa svars 2,800 – 3,200 kg, pazemināts muskuļu tonuss, diviem jaundzimušajiem tika konstatēta dzelte. Tomēr, nosakot jaundzimušo asinīs HIV1 vīrusu pēc polimerāzes ķēdes reakcijas (PĶR) paņēmiena, šiem četriem jaundzimušajiem reakcija bija negatīva. Viens no pieciem jaundzimušajiem piedzima priekšlaicīgi 38. grūtniecības nedēļā ar ķermeņa svaru 1,890 kg un garumu 48 cm, elpošana palēnināta, atzīmēta vidēji smaga asfiksija. Bērnam tika nozīmēta ARV terapija. Jaundzimušā asinīs pēc PĶR paņēmiena tika atklāts HIV1 vīruss.

Ar HIV inficētas mātes intrauterīnas augļa HIV inficēšanās iespējas savlaicīga prognozēšana pirmajos sešos grūtniecības mēnešos ļāva mātei nozīmēt no 12. grūtniecības nedēļas antiretrovīrusu terapiju, nodrošināt sekmīgas dzemdības (ķeizargrieziens), uzsākt jaundzimušam ARV terapiju tūlīt pēc dzimšanas un brīdināt māti par liegumu barot jaundzimušo ar krūti. Nozīmētā terapija ļāva samazināt ar HIV inficētas mātes augļa inficēšanās risku četriem no pieciem jaundzimušajiem.

Informācijas avoti:

1. Белоусов Е.С., Змушко Е.И., ВИЧ инфекция. 2 изд., СПб.: Питер, 2003, с.157-158.
2. Ethnic difference of Helicobacter pylori gastritis: Korean and Japanese gastritis is characterized by male- and antrum-predominant acute foveolitis in comparison with American gastritis [Text] / I/ Lee, M. Kim [et al.] / World Journal of Gastroenterology. – 2005. – Vol.11 (1). – P.94–98.
3. Mody G.M., Hammond M.G. Differences in HLA-DR association with rheumatoid arthritis among migrant Indian communities in South Africa. Br.J. Rheumatol., 1994, 33, 425-427.
4. Nelson J.L., Boyer G., Templin D. et.al. HLA antigens and Tlingit Indians with rheumatoid arthritis. Tissue Antigens, 1992, 40, 57-63.

5. Salvarini C., Macchioni P., Mantovani W. et. al. Extraarticular manifestations of rheumatoid arthritis and HLA antigens in northern Italy. *J. Rheumatol*, 1992, 19, 242-246.
6. Sattar M.A., Al-Saffar M., Guindi RT. et. al. Association between HLA_DR antigens and rheumatoid arthritis in Arabs. *Ann. Rheum. Dis.*, 1990, 49, 147-149.
7. Seglias J., Li E.K., Cohen M.G. et.al. Linkage between rheumatoid arthritis susceptibility and the presence of HLA-DR4 and DR beta allelic third hypervariable region sequences in southern Chinese persons. *Arthr. Rheum.*, 1992, 35, 163.
8. Pat. RU 2542459, C1, 2015, G01N33/53.
9. Yee L.J., tang J., Herrera J., Kaslow R.A., van Leeuwen D.J. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with cirrhosis from chronic hepatitis C virus infection. *Genes Immun.* 2000 Aug; 1 (6): 386–90.
10. <http://pmarchive.ru/geneticheskaya-diagnostika-polimorfizm-genov-citokinov/>, 02.10.2015.
11. Pat. LV P-15-118, 2015, G01N33/53.
12. Nolan T. Hands RE, Bustin SA (2006). „Quantification of mRNA using real-time RT-PCR”. *Nat.Protoc.* 1: 155901582. DOI:10.1038/nprot.2006.236 (<http://dx.doi.org/10.1038%2Fnprot.2006.236>), PMID: 7406449.
13. Dimitriadis E, White CA, Jones RL, et al. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update.* 2005; 11:61330.
14. Dimitriadis E., Menkhorst E., New generation contraceptives: interleukin 11 family cytokines as nonsteroidal contraceptive targets. *Journal of Reproductive Immunology* 88 (2011) 233-239.
15. Simbirtsev A.S. Achievements and perspectives of the recombinant cytokine therapy in clinical practice. *Medical academic journal*, 2013, Volume 13, number 1.

16. <https://www.rndsystems.com/products/luminex-immunoglobulin-iso...>
08.02.2016
17. <https://www.rndsystems.com/products/luminex-screening-and-perf...>,
08.02.2016
18. <https://www.luminexcorp.com/research/reagents-and-accessories/antibody-coupling-kit/product-details/...>, 08.02.2016
19. http://www.mdr7.opecar.ru/Publications/Publication_2.html, 15.09.2015.
20. <http://www.eurolab.ua/aids/2878/2888/35438>, 15.09.2015.
21. <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/migration/en/filelibrary/cell-tissue-analysis/qubit-all-file-types.par.0519.file.dat/qubit-2-fluorometer-user-manual.pdf>, 15.09.2015.
22. <http://www.tiensmed.ru/news/citokiny-ab1.html>, 15.09.2015.
23. ABI PRISM 310 фирмы «Applied Biosystems» (USA),
http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_041857.pdf.
24. BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, catalog number: 4337455.
25. Thermo Scientific GeneJET PCR Purification Kit, Catalog number: K0701,
<https://www.thermofisher.com>, Fermentas Lietuva.
26. NCBI (National Center for Biotechnology Information)
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
27. Human Genome Project Information (2013). SNP Fact Sheet.
http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/faq/snps.shtml.
28. National Human Genome Research Institute (2013). Genome-Wide Association Studies. <http://www.genome.gov/20019523>.
29. Armonk, NY. IBM Corp. Released 2013 IBM SPSS Statistics for Windows, version 22. IBM Corp. <http://www-01.ibm.com/support/>, 02.10.2015.

PRETENZIJAS

1. Ar HIV inficētas mātes intrauterīnas augļa HIV inficēšanās prognozēšanas paņēmieni pirmajos sešos grūtniecības mēnešos, kas raksturīgs ar to, ka mātes asins leukocītos nosaka citokīnu TNF α , IL2, IL4, IL12 β , IL10, INF γ mutācijas, mātes asins serumā nosaka interleikīnu IL2, IL12 daudzumu un, ja citokīnos konstatē 12 mutācijas TNF α -238, TNF α -308, IL2-330, IL2+166, IL4-33, IL4-1098, IL4-590, IL12 β -1188, IL10-592, IL10-819, IL10-1082, INF γ +874, turklāt IL2 saturs asins serumā ir 14 pg/ml un mazāk, bet IL12 saturs ir 74 pg/ml un mazāk, tad prognozē intrauterīnu augļa HIV inficēšanos.

2. Paņēmieni saskaņā ar 1. pretenziju, kas raksturīgs ar to, ka no leukocītiem izdala DNS, veic tās pilna genoma sekvenēšanu, ar apgrieztās transkripcijas metodi (RT PCR) veic DNS amplifikāciju, nosaka atsevišķu nukleotīdu izmaiņas citokīnu gēnu struktūrā, un kā gēnu specifiskus praimerus izmanto Oligo: IL2F60, 9/263(110-300); IL2R44/260(110-300); IL4F60.9/176(-30-1200); IL4R80/255(-30-1200); IL12BF32.1/251(-990-1208); IL12BR52.4/151(-990-1208); TNF α F50.0/238(234-450); TNF α R52.6/237(234-450); IL10F65.0/269(-520-1210); IL10R68.7/290(-520-1210); INF γ F65.0/262(-790-910); IFN γ R66.0270(-790-910).

3. Paņēmieni saskaņā ar 1. vai 2. pretenziju, kas raksturīgs ar to, ka interleikīnu IL2 un IL12 saturu asins serumā nosaka ar divkāāršo antivielu palīdzību pēc xMAP tehnoloģijas "sendvič"-varianta cietās fāzes imūnfermentu multikompleksās analīzes LUMINEX.