



УКРАЇНА

ДЕРЖАВНЕ  
ПАТЕНТНЕ  
ВІДОМСТВО

(19) UA (11) 13413 (13) A

(51)6 A 61 B 10/00

ОПИС ДО ПАТЕНТУ  
НА ВІНАХІДбез проведення експертизи по суті  
на підставі Постанови Верховної Ради України  
№ 3769-XII від 23.XII. 1993 р.Публікується  
в редакції заявника

(54) СПОСІБ ДОКЛІНІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ СТУПЕНЯ ТЯЖКОСТІ ПІЗЬНОГО ГЕСТОЗУ

1

(21) 96051953

(22) 20.05.96

(24) 16.12.96

(46) 28.02.97. Бюл. № 1

(47) 16.12.96.

(56) Султанова Э.М., Мухамедиева Ш.Г., Салихов Ш.И., Мордухович А.С. "Эндогенные токсины пептидной природы при осложненном течении беременности. - Медицинский журнал Узбекистана, 1989, № 7, с 43-46 (прототип).

(72) Грищенко Валентин Іванович, Щербина Микола Олександрович, Семенченко Олександр Юрьевич, Ліпко Оксана Петрівна

(73) Харківський державний медичний університет (UA)

(57) Способ доклинической диагностики степени тяжести позднего гестоза, включающий определение суммарного содержания фракций низкомолекулярных пептидов, о т л и ч а ю щ и й с я тем, что дополнительно к суммарному содержанию фракций опреде-

2

ляют количественные значения фракций В, В<sub>1</sub>, Е, D, F, G, G<sub>1</sub>, Н, Н<sub>1</sub> и при уменьшении суммарного содержания фракций В и В<sub>1</sub> до 11,7%  $\pm$  0,8 и увеличении суммарного содержания фракций F и G до 21,5%  $\pm$  1,2 диагностируют нефропатию I-й степени; уменьшение фракции D до 19,2 %  $\pm$  1,7, увеличение суммарного содержания фракции F и G до 26,5%  $\pm$  1,1 диагностируют нефропатию II-й степени; снижение фракции D до 7,2%  $\pm$  0,9, увеличение суммарного содержания фракций F и G до 31,3%  $\pm$  1,5 - нефропатию III-й степени; повышение суммарного содержания фракций F и G до 42,7%  $\pm$  4,2, появление фракций G<sub>1</sub>, Н<sub>1</sub> диагностируют преэклампсию; увеличении фракции Е до 2,8%  $\pm$  0,2 и суммарного содержания низкомолекулярных пептидов до 7,4%  $\pm$  0,4 диагностируют претоксикоз по сравнению с аналогичными показателями у здоровых беременных.

Изобретение относится к акушерству, а именно к патологии беременности и родов, и может быть использовано для доклинической диагностики степени тяжести позднего гестоза.

Поздние гестозы на протяжении многих столетий остаются основным осложнением гестационного процесса и до настоящего времени являются до конца не решенной

проблемой. Особую тревогу в последние годы вызывает изменение клинического течения поздних гестозов в виде атипично протекающих или малосимптомных форм с тяжелыми морфофункциональными нарушениями в материнском и плодовом организмах. Диагностика степени тяжести гестоза в таких ситуациях представляет значительные трудности для практиче-

(19) UA (11) 13413 (13) A

ских врачей, а недооценка степени тяжести состояния беременной влечет за собой неадекватность терапии и развитие таких грозных для жизни матери и плода осложнений, как пре- и эклампсия.

Все вышеоказанное диктует необходимость поиска высокоинформативных и достоверных способов диагностики позднего гестоза и оценки степени его тяжести.

В настоящее время существует множество различных способов диагностики позднего гестоза. Большинство из них направлено на изучение определенных показателей крови. Так, например, для диагностики доклинических форм гестозов предлагают использовать показатели осмотической и перекисной резистентности эритроцитов. Недостатками этого метода является то, что осмотическая и перекисная резистентность эритроцитов меняется не только при поздних гестозах, но и при иммунологическом конфликте и некоторых других осложнениях гестационного процесса (Л.В. Василенко, Л.Л. Зимина. Диагностика и лечение доклинических форм гестозов // Педиатрия, акуш. и гинек., 1991, № 2, с. 54-55).

Для ранней диагностики гестоза определяют активность комплексных соединений гепарина (плазминоген-плазмин-гепарин и адреналин-гепарин) в крови (А.П. Марусов, Н.В. Сократов. Ферментативный и неферментативный фибринолиз крови и мочи при нефропатии беременных // Акуш. и гинек., 1984, № 3, с. 40-41). Недостатком этого метода является невозможность оценки степени тяжести позднего гестоза и диагностики его доклинических форм.

Некоторые авторы рекомендуют определение активности сукцинатдегидрогеназы и  $\alpha$ -глицерофосфатдегидрогеназы для ранней диагностики позднего гестоза, основываясь на снижении активности этих ферментов при данной патологии (Е.И. Мамаева, Н.В. Стрижова, В.М. Мищенко. Цитохимическое исследование активности ферментов лейкоцитов при позднем токсикозе беременных // Акуш. и гинек. 1985, № 5, с. 29-31). Недостатком этого метода является то, что этот метод не информативен для диагностики доклинических форм, невозможно прогнозировать степень тяжести гестоза.

Г.М. Боголюбова с соавт. (1991) для доклинической стадии гестоза предлагают фракционирование активированной эуглобулиновой фракции плазмы крови. При наличии белковых полос с коэффициентов электрофоретической подвижности 0,41 - 0,46 и 0,61 - 0,67 диагностируют поздний

гестоз (доклиническую стадию). (Г.М. Боголюбова, Б.Н. Новиков, Н.Н. Волков, М.Г. Шнейерсон, И.Г. Щербак. Авторское свидетельство № 1659026, А1 кл. А 61 В 10/00, 1991). Недостатком этого метода является невозможность прогнозирования степени тяжести гестоза у данной больной, а следовательно и назначение адекватной индивидуальной терапии и выработки тактики ведения беременности родов и выбора наиболее оптимальных сроков и методов родоразрешения.

Для диагностики позднего гестоза ряд авторов предлагают определение средних молекул различными методами (Э.М. Султанова, Ш.Г. Мухамедиева, Ш.И. Салихов, А.С. Мордухович. Эндогенные токсины пептидной природы при осложненном течении беременности // Медицинский журнал Узбекистана, 1989, № 7, с. 43-46), одним из которых является метод гелевой хроматографии сыворотки крови на колонке с сефадексом, G-15, позволяющим идентифицировать 8 фракций пептидов. Авторами установлено, что при осложненном течении беременности достоверно увеличено содержание низкомолекулярных пептидов. Однако, сами авторы указывают на то, что даже при нормальном течении беременности содержание этих пептидов увеличивается, за счет фракции с молекулярной массой 3000 дальтон. Кроме того, содержание тотальной фракции низкомолекулярных пептидов может быть увеличено не только при позднем гестозе, но и при других осложнениях гестационного процесса. Сефадекс G-15, используемый в этом методе, позволяет идентифицировать 8 фракций пептидов, однако есть другие гели, например, Toyperl HW-40, который позволяет выделить 10-12 фракций пептидов.

Указанный способ диагностики позднего гестоза является наиболее близким к заявляемому по технической сущности и достигаемому результату, и выбран нами в качестве прототипа.

В основу изобретения положена задача повышения достоверности и точности диагностики позднего гестоза путем доклинической диагностики степени его тяжести.

Поставленная задача решается тем, что дополнительно к суммарному содержанию низкомолекулярных пептидов определяют количественные значения отдельных фракций, и по их качественному и количественному изменению по сравнению со здоровыми беременными диагностируют степень тяжести позднего гестоза.

Способ заключается в том, что забор крови у женщин производят натощак в коли-

честве 7–10 мл. Кровь центрифугируют, сыворотки в пластиковых ампулах в количестве 2–5 мл хранят в замороженном состоянии. Перед хроматографическим анализом сыворотки размораживают и центрифугируют при 10000 Дб, 10 минут. Гельфилтрация проводится в пластиковых колонках длиной 400 мм и внутренним диаметром 16 мм, заполненных поливиниловым гелем Toyoperl HW-40 (Toyosoda, Япония). Эта марка геля позволяет разделять пептидные молекулы в диапазоне молекулярных масс от 10000 до 100 дальтон. Белки с молекулярной массой более 10000 дальтон, т.е. основная масса белков сыворотки крови, исключается из объема геля и вымывается из колонки в "мертвом" объеме ( $V_0$ ) одним пиком, площадь под которым дает количественные данные о содержании общего белка в сыворотке крови.

Образцы неразведенной сыворотки после центрифугирования наносятся на колонку при помощи петлевого инжектора, имеющего фиксированные объемы от 0,1 до 1,0 мл. Опытным путем было установлено, что для хорошо читаемой хроматографии оптимальной порцией для введения образца является 0,15 мл. В случае появления зашкаленных пиков при хроматографии сывороток, имеющих в отличие от нормы, повышенное содержание отдельных фракций, вводимые порции уменьшались до 0,1 мл, или же снижались чувствительность оптического регистратора. В качестве элюента используют буфер, содержащий: 15 Ммоль Трис-НСl, 0,15 моль NaCl, pH 7,4 или 0,02 моль  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,1 моль NaCl, 0,1 моль мочевины, pH 7,0. Смена буфера практически не меняет времени удерживания фракций. Буфер подается в колонку с помощью перистальтического насоса Microperplex 11. Оптимальной скоростью потока подвижной фазы для этого типа геля является 1,6 – 1,8 мл в минуту, что позволяет проводить один анализ в течение 1,5 – 2 ч. Хроматографию осуществляют на оборудовании фирмы LKB (Швеция). В качестве детектора используют ультрафиолетовый оптический монитор Uvicord SII при длине волны 254 нм, дающий возможность одновременной регистрации в двухканальном режиме. При этом на самопишущем потенциометре хроматограмма записывается в диапазоне относительной оптической плотности (AUFS) 2,0 и 0,02. На выходе из оптического монитора перед введением образца и после окончания хроматографии капилляр подсоединяют к стеклянной пипетке на 5 мл, скорость наполнения которой измеряется секундоме-

ром, после чего рассчитывается скорость потока с точностью  $\pm 0,001$  мл/мин.

Для определения значения молекулярных масс получаемых фракций колонка калибруется по пептидным стандартам с известной молекулярной массой. В качестве стандартов использовали инсулин, инсулин-А цепь, инсулин-В цепь, глюкагон, соматостатин, трипсиновый гидролизат миоглобина лошади. После хроматографии стандартных пептидов были определены объемы элюента до выхода пиков ( $V_e$ ) и построен график отношения  $V_e$  к логарифму молекулярных масс, по которому были рассчитаны молекулярные массы фракций "средних" молекул, приведенные в табл. 1.

Количество фракций выражалось в процентах от суммы площадей под пиками, вычислявшиеся как произведение высоты пика в мм на ширину пика на полувысоте. Фракции А–Аз, а в некоторых хроматограммах А–А5 не обсчитывались в виду незначительного их количества. Анализировались два параллельных образца, а в случае нестабильности условий, в результате которых хроматограммы одного и того же образца сыворотки крови отличались, делались 4–5 повторов, по которым получались усредненные данные.

В результате проведенного исследования было выявлено, что содержание определенных фракций низкомолекулярных пептидов коррелирует со степенью тяжести гестоза и претоксикозом.

Так установлено, что для нефропатии I-й степени тяжести характерно уменьшение суммарного содержания фракций В и В1 до  $11,7\% \pm 0,3$  и увеличение суммарного содержания фракций F и G до  $21,5\% \pm 1,2$  по сравнению со здоровыми беременными  $14,9\% \pm 0,5$  и  $15,2\% \pm 0,9$  соответственно.

Для нефропатии II-й степени характерно снижение фракции D до  $19,2\% \pm 1,7$  против  $27,8\% \pm 1,3$  у здоровых беременных и увеличение фракций G и F до  $26,5\% \pm 1,1$ .

Для нефропатии III-й степени характерно снижение фракции D до  $7,2\% \pm 0,9$ , увеличение суммарного содержания F и G до  $31,3\% \pm 1,5$ .

Для преэклампсии характерно снижение фракции D до  $3,9\% \pm 1,4$ , повышение суммарного содержания F и G  $42,7\% \pm 4,2$ , появление фракций G1, H1.

Для претоксикоза характерно увеличение фракции E до  $2,8\% \pm 0,2$  (против  $1,2\% \pm 0,6$  у здоровых беременных) и увеличение суммарного содержания низкомолекулярных пептидов с  $4,6\% \pm 0,3$  у здоровых

беременных до  $7,4\% \pm 0,4$  у беременных с претоксикозом.

Таким образом, проведенное исследование показало, что определенные фракции низкомолекулярных пептидов могут являться маркерами претоксикоза и степени тяжести гестоза. Это обстоятельство можно объяснить, исходя из нескольких теоретических положений:

Фракции F, G, G<sub>1</sub>, H, H<sub>1</sub> относятся к эндотоксинам. Являясь продуктами гидролиза белков они токсически воздействуют на организм, приводя к поражению жизненно важных органов (печени, почек, головного мозга) – органов, которые в первую очередь поражаются при позднем гестозе. (Dzuric R, Adam J, Valorcova E, Peznicek J. The effects of haemodialysis on blood peptide levels // Proc. Eur. Dial. Trans. Ass., 1971, v. 8, p. 167), а фракции B, B<sub>1</sub> и D способствуют повышению блокирующей активности сыворотки крови, которая играет защитную роль в развитии иммунологических реакций агрессии при позднем гестозе, поэтому снижение содержания фракций B, B<sub>1</sub> и D приводит к ослаблению иммунологической защиты при позднем гестозе.

**П р и м е р № 1.** Больная Огульчанская А.Е. 22 лет, диагноз: беременность 33–34 недели, первая. Настоящая беременность протекала гладко. Прибавка в весе равномерная, артериальное давление не повышалось, клинический анализ мочи в пределах нормы. Хроматографический анализ сыворотки крови следующий:

Суммарное содержание низкомолекулярных пептидов в % содержании к общему белку – 7,6%, содержание фракции E – 3,2%. На основании данных хроматографического исследования больной был поставлен диагноз: претоксикоз, но учитывая отсутствие других признаков претоксикоза, лечение не проводилось.

В 36 недель у беременной отмечено повышение артериального давления до 140/90 – 150/100, появился белок в моче до 0,04 г/л, отеки нижних конечностей. Беременной был поставлен диагноз: беременность 36 недель. Нефтопатия I-й – II-й степени. Беременная была направлена на стационарное лечение в 5-й родильный дом, история родов № 745.

В стационаре назначено лечение нефропатии: дибазол, эуфиллин, анаприлин, гепарин, в результате чего артериальное давление было в пределах 130/80–140/90. Данные биохимического и клинического анализа крови, коагулограммы в пределах нормы.

В 37 недель беременности больной был проведен повторно хроматографический анализ, результаты которого следующие: суммарное содержание фракций F и G – 40,2%, фракция D – 3,2%, имелись фракции G<sub>1</sub> и H<sub>1</sub>, что указывало на ухудшение состояния больной и по данным хроматографического исследования соответствовало преэклампсии. Однако, учитывая цифры артериального давления 130/80 – 140/90, беременная не была родоразрешена досрочно, а получила вышеописанную терапию.

В 37 недель беременности на фоне повышения артериального давления до 160/90 произошел приступ эклампсии, в связи с чем беременная была родоразрешена путем операции кесарева сечения в ургентном порядке. Извлечен живой гипотрофичный мальчик по Апгар 5–6б. В течение 3-х недель больная находилась в реанимационном отделении, где проводилось интенсивное лечение гестоза.

**П р и м е р № 2.** Беременная Белостоцкая Е.П., 25 лет. История родов № 165, поступила в 5-й родильный дом 26.01.1994 года с диагнозом: беременность 34–35 недель, Р III. I-головное передний вид. Нефропатия I-й степени.

Из анамнеза: I-я беременность в 1989 году, закончилась нормальными родами, родила девочку весом 3,600. В 1990 году – искусственный аборт. В 1992 году – нормальные роды, мальчик 3,900. Настоящая беременность IV, протекала с явлениями угрозы прерывания беременности. С 34 недель появились выраженные отеки нижних конечностей. В клиническом анализе крови, мочи, биохимическом анализе крови, коагулограмма в пределах нормы. Артериальное давление 115/75–120/80 мм рт.ст.

Больной проводилось лечение гестоза: диета, гипотиазид, аспаркам.

В 36 недель беременной проведен хроматографический анализ сыворотки крови, в результате которого установлено: суммарное содержание фракций F и G – 30,3%, содержание фракции D – 8,6%, что соответствовало нефропатии III степени, однако клинически, кроме выраженных отеков нижних конечностей, других признаков гестоза не было.

В 38 недель беременности произошел приступ эклампсии.

**П р и м е р № 3.** Больная Мельникова А.Н., 24 лет. История родов № 272, поступила в 5-й родильный дом 16.04.96, с диагнозом: беременность 38 недель, Р I, I тазовое передний вид. Нефропатия I-й степени. Из анамнеза: настоящая беременность первая. С 32

недель у беременной отмечались отеки, проходила амбулаторное лечение диуретиками, препаратами калия, диетой. Белка в моче не было.

С 37 недель отметила повышение артериального давления до 160/100 мм рт.ст., в связи с чем направлена в стационар. В клиническом анализе крови, мочи, биохимическом анализе крови, коагулограмма в пределах нормы. 16.04.96, был произведен хроматографический анализ сыворотки крови, результаты которого следующие: суммарное содержание фракций F и G – 38,6%, содержание фракции D – 4,9%, появление

фракции H<sub>1</sub>, что указывало на преэклампсию по данным хроматографии. Учитывая это, а также тазовое предлежание, беременная была родоразрешена 18.04.96 путем операции планового кесарева сечения в 38 недель беременности. Извлечена девочка по Апгар 6-7 баллов, весом 3,300. Послеоперационный период протекал гладко.

Таким образом, хроматографическое исследование сыворотки крови является высокоинформативным методом диагностики как претоксикоза, так и степени тяжести гестоза, особенно в случаях с маловыраженной клинической симптоматикой.

15

Средняя молекулярная масса фракции и объем элюента ( $V_e$ ), вымывающего фракцию при гельфильтрации на колонке (длина 40 мм, внутренний диаметр 16 мм), заполненной поливиниловым гелем Toyoperl HW-40.

Фракция	$V_e$ , мл	Мол.масса (дальтон)	Фракция	$V_e$ , мл	Молекулярная масса (дальтон)
$V_0$	$22,9 \pm 0,8$	$>12600$	C	$74,4 \pm 0,9$	$3660 \pm 3,0$
A	$33,6 \pm 0,4$	$7640 \pm 100$	C <sub>1</sub>	$78,5 \pm 1,0$	$3520 \pm 20$
A <sub>1</sub>	$37,3 \pm 0,5$	$6700 \pm 120$	C <sub>2</sub>	$79,5 \pm 0,8$	$3480 \pm 20$
A <sub>2</sub>	$39,2 \pm 0,5$	$6190 \pm 180$	D	$90,5 \pm 0,9$	$3120 \pm 20$
A <sub>3</sub>	$42,7 \pm 0,4$	$5670 \pm 50$	E	$102,0 \pm 1,3$	$2840 \pm 30$
A <sub>4</sub>	$47,7 \pm 0,7$	$5140 \pm 70$	F	$114,5 \pm 0,8$	$2560 \pm 20$
A <sub>5</sub>	$51,2 \pm 0,8$	$4860 \pm 60$	G	$124,3 \pm 1,3$	$2360 \pm 20$
A <sub>6</sub>	$54,1 \pm 0,4$	$4480 \pm 30$	G <sub>1</sub>	$133,2 \pm 1,2$	$2200 \pm 30$
B	$61,5 \pm 0,4$	$4220 \pm 50$	H	$177,2 \pm 1,4$	$1550 \pm 30$
B <sub>1</sub>	$67,4 \pm 0,6$	$3930 \pm 20$	H <sub>1</sub>	$204,1 \pm 3,0$	$1240 \pm 40$

Упорядник

Техред М.Моргентал

Коректор О.Кравцова

Замовлення 4114

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,  
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул.Гагаріна, 101

