



УКРАЇНА

(19) UA (11) 60076 (13) A

(51) 7 A61B10/00, G01N33/538

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВИДАЄТЬСЯ ПІД
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ
ВЛАСНИКА
ПАТЕНТУ

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ПРЕЕКЛАМПСІЇ ВАГІТНИХ

1

2

(21) 2003010574

(22) 22 01 2003

(24) 15 09 2003

(46) 15 09 2003, Бюл. № 9, 2003 р.

(72) Сазоненко Леся Володимирівна, Втовський Ярослав Мирославович, Брюзгіна Тетяна Семеновна

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ

(57) Спосіб діагностики прееклампсії вагітних шляхом оцінки стану перекисного окислення ліпідів,

який відрізняється тим, що визначають жирнокислотний спектр сироватки крові, а саме вміст олеїнової та лінолевої кислот, есенціальних жирних кислот (ейкозатрієнової, арахідонової, ейкозапентаєнової), а також суму поліненасичених жирних кислот, розраховують співвідношення сумарного вмісту есенціальних жирних кислот до вмісту олеїнової кислоти та вмісту лінолевої кислоти до суми поліненасичених жирних кислот і при їх значеннях 0,30 і більше та 0,82 і менше, відповідно, діагностують прееклампсію вагітних

Винахід, що заявляється, відноситься до медицини, зокрема до такого її розділу, як акушерство і гінекологія, і може бути використаний для підвищення точності і інформативності діагностики прееклампсії вагітних.

Прееклампсія залишається однією з найбільш актуальних проблем в акушерстві. Це пов'язано з частотою даної патології (11-16%), яка є основною причиною материнської та перинатальної захворюваності і смертності і одним з найнебезпечніших ускладнень вагітності і пологів [1].

Відомі способи діагностики прееклампсії не забезпечують точності встановлення діагнозу, а саме від точності встановлення діагнозу прееклампсії залежить своєчасність призначення специфічного, патогенетичне об'єднаного лікування, необхідного для попередження розвитку тяжких ускладнень для вагітної та плоду. Це можна пояснити тим, що жоден з відомих способів діагностики не враховує всіх патогенетичних змін, що лежать в основі розвитку прееклампсії, зокрема не враховується стан ендотелію - основного органу-мішені, який зацікавлений в розвитку прееклампсії.

Так, відомий спосіб діагностики прееклампсії, що передбачає визначення стероїдного профілю сечі вагітної (андростерон, етіохоланолон, дегідроепіандростерон, 11-кетандростерон, 11-кетопрегнандіол, 11-гідроксиандростерон, 11-гідроксиетіохоланолон, прегнандіол, прегнанолон, естрадіол, холестерин та ін.) [2]. Зміни кожного показника коливаються в межах від 10 до 97%, залежно від ступеня тяжкості прееклампсії. Як ви-

дно, дана методика для встановлення діагнозу прееклампсії потребує визначення дуже великої кількості параметрів, кожен з яких має свою похибку, сумарна похибка при цьому буває досить високою, тому даний спосіб не може бути достатньо точним. Обмеженням цієї методики є відсутність характеристики стану мембран, що знижує його інформативність.

Відомий також спосіб діагностики прееклампсії вагітних, за яким для характеристики стану перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) визначають вміст дієнових кон'югатів (ДК), малонового діальдегіду (МДК) та активність супероксиддисмутази (СОД). Вміст ДК і МДК у вагітних з прееклампсією перевищує середній показник в 1,67 рази, активність СОД залишається незмінною [3]. Оскільки стан ПОЛ не є специфічним механізмом розвитку прееклампсії (підвищення рівня ПОЛ спостерігається і при багатьох інших гіпоксичних станах), то цей спосіб не дає можливість точно діагностувати прееклампсію. Обмеження способу ще й в тому, що дані показники характеризують зміни стійкості лише еритроцитарних мембран у вагітних, що знижує його інформативність.

Найближчим аналогом (прототипом) способу, що заявляється, є спосіб діагностики прееклампсії вагітних шляхом визначення оцінки стану перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) у сироватці крові, зокрема концентрації ліпоперексидів за вмістом малонового діальдегіду (МДА) - продукту пероксидації ненасичених жирних кислот [4]. Спектри поглинання вимірюють на спектрофотометрі "Спе-

(13) A
(11) 60076
(19) UA

корд М40" Визначення окислення ліпопротеїдів в сироватці крові проводять за методом K Yagi Розрахунок концентрації МДА проводять з використанням коефіцієнту молярної екстинкції для продукту реакції малоновий діальдегід/тіобарбітурова кислота (1 2) Оцінка спектрів поглинання видимого спектру (500-600нм) показала, що максимум поглинання припадає на 535-540 нм, що є характерним для продукту реакції МДА/тіобарбітурова кислота (1 2), а інтенсивність поглинання залежить від його концентрації Вміст ліпоперекисів в сироватці крові вагітних з прееклампсією знаходився в інтервалі 20-29нмоль МДА на 1мл сироватки Вимірюваний рівень окислення ліпідних пероксидів в залежності від умов експерименту може підвищуватись в 6-20 разів

Дана методика є недостатньо точною, тому що залежність отриманих результатів від умов експерименту коливається в дуже широких межах Спосіб-прототип має ще й наступні недоліки характеризує процес перекисного окислення ліпідів лише за рівнем перекисів ненасичених жирних кислот Цей параметр тільки опосередковано вказує на співвідношення вазоконстрикторних та вазодилаторних медіаторів, що синтезуються ендотелієм (підвищений рівень окислення ліпопротеїдів пригнічує синтез простагліну і NO в ендотелі судин) Це знижує інформативність даної методики

Задача, що вирішується винаходом, полягає у вдосконаленні способу діагностики прееклампсії вагітних шляхом оцінки стану перекисного окислення ліпідів та ендотелію на основі визначення жирнокислотного спектру сироватки крові

Технічним результатом нового способу буде підвищення точності та інформативності діагностики прееклампсії вагітних, а також можливість динамічного контролю за станом ендотеліальних мембран

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі діагностики прееклампсії вагітних шляхом оцінки стану перекисного окислення ліпідів, згідно винаходу, визначають жирнокислотний спектр сироватки крові, а саме вміст олеїнової та лінолевої кислот, есенціальних жирних кислот (ейкозатрієнової, арахідонової, ейкозапентаєнової), а також суму поліненасичених жирних кислот, розраховують співвідношення сумарного вмісту есенціальних жирних кислот до вмісту олеїнової кислоти та вмісту лінолевої кислоти до суми поліненасичених жирних кислот і при їх значеннях 0,30 і більше та 0,82 і менше, відповідно, діагностують прееклампсію вагітних

Відмінною особливістю запропонованого способу є використання для діагностики прееклампсії нового, більш специфічного критерію, яким є вміст поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) та жирнокислотний спектр сироватки крові загалом Це дає можливість дослідити саму основу метаболічних зрушень в організмі вагітної У прототипі стан ПОЛ характеризується на основі аналізу вмісту малонового діальдегіду, який є продуктом пероксидації ПНЖК і засвідчує лише факт активації процесу пероксидації, що не є специфічним для стану прееклампсії вагітних і може спостерігатись при різноманітних патологіях (інфекційні захворювання, патологія нирок, печінки, акушерська пато-

логія та інші) За доступними даними такий спосіб діагностики невідомий

Запропонований спосіб діагностики прееклампсії вагітних здійснюється наступним чином Для дослідження жирнокислотного спектру ліпідів беруть 5мл крові вранці натще з кубітальної вени вагітної, яку центрифугують для отримання сироватки

Екстракцію ліпідів з сироватки проводять за відомим методом Фолча Пробу сироватки в кількості 0,5-1,0мл поміщають в пробірку з притертою пробкою ємністю 10мл, додають 5-7мл суміші хлороформ/метанол (у співвідношенні 2 1) і тримають 30хв в холодильнику Для кращого розділення фаз додають 1мл дистильованої води Далі відбирають хлороформну нижню фазу піпеткою Пастера Для повної реакції етап екстракції повторюють двічі Об'єднані хлороформні екстракти концентрують упарюванням до сухості в потоці азоту при -45°C на водяній бані

Гідроліз та метилювання вищих жирних кислот ліпідів здійснюють за методом Синяк КМ, який полягає в тому, що до сухого осаду ліпідів додають 5мл 1% H_2SO_4 в метанолі і переносять розчин в скляну ампулу ємністю 10мл Після запарювання проводять гідроліз і метилювання в термостаті при -85°C протягом 20 хвилин

Екстракцію метильованих жирних кислот проводять двічі гексан-ефірною сумішшю (у співвідношенні 1 1) в кількості 5мл Для розділення фаз додають 1мл дистильованої води Відбирають верхню фазу піпеткою Пастера Об'єднані екстракти випарюють до сухості в потоці азоту при -45°C на водяній бані Сухий осад розчиняють в 40-50мл чистого гексану і вводять у випарювач хроматографа в кількості 5мкл

Газохроматографічний аналіз спектру жирних кислот ліпідів здійснюється на газовому хроматографі серії Цвт-500 в ізометричному режимі з площенисто-іонізаційним детектором при наступних умовах для визначення спектру жирних кислот ліпідів використовують скляну колонку (розміром 3мх0,3см), яка заповнена фазою 5% ПЕГС на хроматоні N-AW-HMDS (зерніння 0,125-0,160мм), температура колонки 190°C, температура випарювача 250°C, витрата азоту і водню 35мл/хв, повітря - 200мм/год, швидкість діаграми стрічки 240мм/год, чутливість шкали $10^{-7}A$, об'єм проби, що вводиться, 3-5мкл, тривалість аналізу - 20хв

Кількісну оцінку спектру жирних кислот ліпідів проводять за методом нормування площ і визначають долі кислот в процентах Похибка визначення становить 10% [7] В спектрі жирних кислот (ЖК) визначають вміст олеїнової (C18 1) та лінолевої (C18 2) кислот, як найбільш чутливих до змін, що відбуваються в організмі вагітної з прееклампсією, а також есенціальні жирні кислоти (ейкозатрієнову, арахідонову, ейкозапентаєнову) та суму ПНЖК (лінолеву, ейкозатрієнову, арахідонову, ейкозапентаєнову), які характеризують стан мембран, в тому числі ендотеліальних, де синтезуються регуляторні медіатори Після цього розраховують співвідношення сумарного вмісту вказаних есенціальних жирних кислот до вмісту олеїнової кислоти $K1 = \Sigma \text{есенц} / C18 1$ та вмісту лінолевої кислоти до суми ПНЖК $K2 = C18 2 / \Sigma \text{ПНЖК}$

Значення K1 0,30 і більше та значення K2 0,82 і менше вважають діагностичними критеріями пре-еклампсії. Коефіцієнт K1 характеризує ступінь накопичення есенціальних жирних кислот та зміни процесу ПОЛ (олеїнова кислота метаболічно неактивна, її вміст відбиває зміни гомеостазу). Коефіцієнт K2 характеризує порушення метаболізму жирних кислот на етапі біосинтезу простагландинів та інших ліпопероксидів - простагландинів, тромбоксанів, лейкотрієнів (лінолева кислота є попередником арахідонової кислоти, яка є субстратом

синтезу даних медіаторів). Вказані значення коефіцієнтів були встановлені на основі власного клінічного дослідження, описаного далі.

Основну групу склали 20 вагітних з пре-еклампсією. Контрольну групу - 20 жінок з фізіологічним перебігом вагітності. Для порівняння була відібрана група з 20 здорових невагітних жінок тієї ж вікової категорії.

Результати газохроматографічного аналізу жирно-кислотного спектру сироватки наведені в таблиці.

Таблиця

Жирні кислоти	Невагітні жінки	Контрольна група	Основна група
C18 1	24,2±1,1	15,9±0,9	14,8±1,0
C18 2	16,0±0,8	24,0±1,3	20,0±1,1
Σесенц	2,8±0,3	3,4±0,3	4,5±0,5
ΣПНЖК	18,8±1,2	27,4±1,3	24,5±1,5
K1=Σесенц/C18 1	0,12	0,21	0,30
K2=C18 2/ΣПНЖК	0,85	0,88	0,82

Як видно з таблиці, у жінок з фізіологічним перебігом вагітності спостерігається активація метаболічних процесів та збільшення синтезу простагландинів (своєрідний запас міцності) за умови підвищеного навантаження на організм вагітної жінки порівняно з невагітними жінками. З іншого боку, розвиток пре-еклампсії вагітних супроводжується порушеннями метаболізму - активацією ПОЛ та зниженням синтезу регуляторних медіаторів.

Отримані останніми роками дані підтримують нашу концепцію про те, що пре-еклампсія є хворобою ендотелію. Саме в ендотелії синтезується ряд медіаторів, що забезпечують авто- та паракринну регуляцію судинного тонуусу, а саме, простагландин, тромбоксан, лейкотрієни, ендотеліальний релаксуючий фактор (NO), ендотеліні, ангіотензин-1 та ін [5]. Запропонований спосіб діагностики пре-еклампсії вагітних дозволяє оцінювати стан ендотелію за вмістом ПНЖК, які є важливим компонентом фосфоліпідів, з яких на 80% складається будь-яка мембрана, в тому числі ендотеліальна.

Приклад конкретного втілення

Вагітна П., 23 роки. Історія хвороби №3954. Поступила у відділення патології вагітних зі скаргами на незначний ниючий біль в потиличній ділянці голови, появу набряків протягом останнього тижня. Термін гестації 39 тижнів.

Об'єктивно загальний стан задовільний. АТ 140/80, 145/80 мм рт.ст. Пульс 86 уд./хв, ритмічний, задовільних властивостей. Набряки гомілок, стоп, кистей. З боку внутрішніх органів патології не виявлено.

Стан плода: кардіотокограма за Фішером - 7 балів, біофізичний профіль - 8 балів.

При дослідженні жирнокислотного спектру ліпідів отримані наступні дані: пальмїтинова кислота 48,2%, стеаринова кислота 10,4%, олеїнова кислота 14,3%, лінолева кислота 21,5%, ейкозатрієнова кислота 0,5%, арахідонова кислота 4,0%, ейкозапентаєнова кислота 1,1%, вміст насичених ЖК 58,6%, вміст ненасичених ЖК 41,4%, вміст поліненасичених ЖК 27,1%. Розрахунок коефіцієнтів дав значення 0,39 і 0,79 для K1 і K2, відповідно. Отри-

мані дані дозволили діагностувати у вагітної пре-еклампсію.

Наступні лабораторні показники підтвердили діагноз пре-еклампсії. Лабораторні дані: Загальний аналіз крові: Hb 120 г/л, L 8,5 10⁹/л, Ht 0,45, тромбоцити 170 г/л, ШОЕ 20 мм/год. Коагулограма: етаноловий тест 2+, нафтоловий тест 3+, протромбіновий індекс 92%, АВР 49", фібриноген 6 г/л, фібрин 22 мг. Біохімія крові: загальний білок 56 г/л, загальний білірубін 20,0 мкмоль/л, прямий білірубін 0, АЛТ 0,49 мкмоль/л, АСТ 0,72 мкмоль/л, сечовина 4,4 мкмоль/л, азот сечовини 1,59 мкмоль/л. Загальний аналіз сечі: білок 0,192 г/л, щільність 1020, епітелій - помірна кількість, лейкоцити 5-6 в полі зору, еритроцити 0-0-1, циліндри - палинові 10-15, солі - оксалати помірно.

Рутинні лабораторні дані підтвердили діагноз пре-еклампсії: характерні зміни біохімії (зменшення рівня загального білку, підвищення вмісту печінкових ферментів - АСТ, АЛТ), підвищення коагуляційних властивостей крові, поява палинових циліндрів в сечі. Спостерігаємо у вагітної класичну триаду Цангемейстера: гіпертензія, набряки, протеїнурія.

В період з серпня 2002 року до січня 2003 року у відділенні патології вагітних Пологового будинку №7 запропонований спосіб включали в схему діагностики пре-еклампсії, у 96% позитивна оцінка співпала з іншими діагностичними критеріями. Даний спосіб діагностики є більш точним порівняно з прототипом, при використанні якого позитивна оцінка співпадала з іншими діагностичними критеріями у 78% випадків.

Таким чином, запропонований спосіб діагностики пре-еклампсії є більш точним та інформативним за рахунок більш повної характеристики процесу перекисного окислення ліпідів та стану ендотелію у вагітних.

Список літератури

1. Липко О.П. Сучасні уявлення про етіопатогенез пізнього гестозу // Педіатрія, акушерство та гінекологія - 1997 - №3 - с. 92-94.
2. Подтетенов А.Д., Братчикова Т.В., Орлова Е.Н.

Стероидные гормоны и их роль в течение беременности и родов // Москва - 2000

3 Берко А Т, Мелехина Л М, Берко Е М. Перекисное окисление липидов у беременных работниц завода "Скиф" // Актуальные вопросы гигиены труда - 1995 - с 284

4 Музя Г И, Куликов В И, Пономарева В И, Сухих Г Н. Окисление липопротеинов в крови женщин при патологическом течении беременности // Клиническая лабораторная диагностика - 1999 -

№3 - с 8-10

5 Moncada S, Higgs EA // New Engl J Med - 1993 - Vol 329 - p 2002-2012

6 Афонина Г Б, Куюн Л А. Липиды, свободные радикалы и иммунный ответ - Киев 2000 - 287с

7 Гичка С Г, Брюзгина Т С, Вретик Г М, Рева С Н. Газохроматографический метод определения липидных показателей крови при ишемической болезни сердца // Украинский кардиологический журнал - 1998 - №7-8 - с 50-52