

УДК 618.3 – 008.6:616.631

ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МОЧИ ПРИ ПРЕЭКЛАПСИИ**Николаев А.А., Одениязова М.А.***ГБОУ ВПО «Астраханский Государственный медицинский университет Минздрава России»,
Астрахань, e-mail: chimnik@mail.ru*

Проведено сравнительное исследование мочи беременных женщин страдавших, гестозом несколькими методами определения белка, начиная с рутинных и заканчивая иммуноферментным анализом. Состав белкового спектра мочи, по нашим данным, коррелирует со степенью тяжести гестоза. Впервые получены данные о достоверном повышении уровня плацентарной щелочной фосфатазы и лактоферрина в моче беременных страдающих преэклампсией. Предложен способ прогноза развития преэклампсии по суммарному уровню плацентарной щелочной фосфатазы и лактоферрина в моче беременных. Проведено динамическое исследование мочи 96 здоровых беременных и определены методом ИФА уровни плацентарной щелочной фосфатазы и лактоферрина в их суточной моче на 20-22 неделе беременности и повторно через 2 недели. Из 96 женщин гестоз развился у 17. Ретроспективный анализ лабораторных данных позволил нам предложить формулу вероятности развития гестоза у беременных женщин уже на 22 неделе беременности.

Ключевые слова: плацентарная щелочная фосфатаза, лактоферрин человека, преэклампсия, анализ мочи**IMMUNOCHEMICAL STUDIES OF URINE IN PREECLAMPSIA****Nikolaev A.A., Odenisova M.A.***Astrakhan State medical University The Ministry of health of Russia, Astrakhan, e-mail: chimnik@mail.ru*

Comparative study of the urine of pregnant women suffering from, preeclampsia several methods of protein determination, starting and ending with a routine enzyme-linked immunosorbent assay. The Composition of the protein spectrum of urine according to our data, correlated with the severity of preeclampsia. First obtained reliable data on the increase in the level of placental alkaline phosphatase and lactoferrin in the urine of pregnant women suffering from preeclampsia. A method of predicting the development of preeclampsia on the total level of placental alkaline phosphatase and lactoferrin in the urine of pregnant women. The dynamic examination of urine and 96 healthy pregnant women determined by ELISA the levels of placental alkaline phosphatase and lactoferrin in their daily urine on the 20-22nd week of pregnancy and again after 2 weeks. Of the 96 women developed preeclampsia at 17. A retrospective analysis of laboratory data allowed us to propose a formula for the probability of developing preeclampsia in pregnant women already on 22 week of pregnancy.

Keywords: placental alkaline phosphatase, human lactoferrin, pre-eclampsia, urine analysis

Преэклампсия (Гестозы) занимают второе место в статистике акушерских осложнений. Их патогенез окончательно не изучен, а диагностика и прогнозирование до настоящего времени представляют собой трудную задачу [4, 8].

На сегодня принято считать, что гестоз – это комплексная эндотелиальная дисфункция (эндотелиоз), при котором происходит нарушение роста, дифференцировки и функционирования сосудов плаценты, связанное с неадекватной продукцией сосудисто-эндотелиального фактора роста, а также нарушение свертывающего потенциала крови с развитием хронического варианта ДВС-синдрома [5].

В клинико-лабораторной оценке течения преэклампсии беременности учитываются такие стандартные лабораторные показатели, как общий анализ крови и мочи, анализы мочи по Нечипоренко, Зимницкому, биохимические показатели крови, показатели системы свёртывания крови и фибринолиза. Однако их чувствительность и специфичность для диагностики преэклампсии незначительны [4].

Несмотря на интенсивные исследования в идентификации молекулярных маркеров гестоза, например, Siddiqui AH et al [9] нашёл наличие аутоантител к ангиотензин-1 рецепторам (АГ1-AA), Jensen et al [7]; обнаружили изменение соотношения CD19(+) CD5(+) В-клеток, задача ранней молекулярной диагностики гестоза остается нерешенной [11].

Поэтому актуальной проблемой является организация исследований по разработке и внедрению новых клинико-лабораторных и иммунохимических методов своевременного обнаружения отклонений в состоянии здоровья женщин, оценке течения беременности, диагностики, лечения и профилактики осложнений гестационного периода.

Плацентарная щелочная фосфатаза (ПЩФ) продуцируется микроворсинками плаценты и эндотелием её новообразующихся сосудов, является органоспецифическим антигеном плаценты, в связи с чем, логично предположить непосредственное участие этого фермента в указанных патологических процессах.

Исследованию ПЩФ, как маркера эмбриональных и малигнизированных тканей, в последние десятилетия уделено большое внимание [9]. Однако, практически не исследовали мочу больных на содержание ПЩФ и других крупных белков, несмотря на то что протеинурия один из главных признаков гестоза.

Цель нашей работы – провести сравнительное исследование мочи беременных женщин страдавших, гестозом несколькими методами определения белка, начиная с рутинных и заканчивая иммуноферментным анализом.

Материалы и методы исследования

Предпринятое исследование представляет собой лабораторное изучение плацентарных и сывороточных белков у беременных женщин, страдавших гестозом и с нормально протекавшей беременностью. В связи с этим были выбраны, наиболее адекватные, методы их изучения.

Объектами нашего исследования были моча беременных женщин страдавших гестозами и с нормально протекавшей беременностью. В работе использовано 30 образцов мочи беременных с неосложнённой беременностью и 65 образцов мочи беременных, страдавших гестозами.

Использовали следующие методы исследования: иммунодиффузионный анализ в агаре (ИДА), иммуноэлектрофорез (ИЭФ), иммуноферментный анализ (ИФА) [6]. Стандартный анализ мочи проводили рутинными методами [2]. Определение активности плацентарной щелочной фосфатазы проводили колориметрически наборами ЗАО «Вектор-Бест», в соответствии с инструкцией производителя.

Статистическую обработку полученных количественных данных осуществляли с помощью пакета статистического анализа Statistica 6, SPSS V 10.0.5, программ «STATLAND», «EXCEL-97», «Basic Statistic» с учетом стандартных методик вариационной статистики, включая вычисление критерия t Стьюдента для оценки достоверности различий. Данные представлены в виде $M \pm m$, достоверные различия обсуждались при $t = < 0,001$.

Результаты исследования и их обсуждение

По данным рутинного исследования мочи, протеинурия у беременных с гестозами регистрируется в 18% случаев. В нашем исследовании иммунохимическими методами с помощью поликлональной кроличьей антисыворотки к сывороточным белкам человека протеинурия выявляется у 95,7% женщин, что достоверно выше ($p < 0,001$).

В группе 50 здоровых беременных женщин рутинным методом протеинурия не выявлена, а иммунохимическим методом обнаружена в 2 случаях в следовых количествах (0,01 г/л). Таким образом, чувствительность иммунохимического метода составляет 95,7%, а специфичность – 93,3%, что имеет несомненное преимущество при выявлении протеинурии перед рутинным методом, который, несмотря на высокую специфичность (100%) имеет низкую чувствительность – 17,6%. Диагностическая эффективность иммунохимического метода составляет 94,8%, тогда как рутинного метода – всего 25,8% ($p < 0,001$).

Состав белкового спектра мочи, по нашим данным, коррелирует со степенью тяжести гестоза. Так, по мере возрастания степени гестоза, наблюдается выход в мочу всё более и более крупных белковых комплексов (от альбумина до иммуноглобулинов), наряду с повышением общей концентрации протеинурии от 0,01 до 1,25 г/л и более (табл. 1).

В составе мочи беременных с гестозом ЩФ колориметрическим методом выявляется в 80,4% случаев с активностью от 1 до 16 ЕД Боданского ($M \pm m = 7,3 \pm 1,4$) также пропорционально степени тяжести протеинурии. В составе мочи здоровых беременных ЩФ колориметрическим методом выявляется в 36,6% случаев с активностью от 1 до 8 ЕД Боданского ($M \pm m = 4,8 \pm 0,6$) (табл. 2).

Таблица 1

Иммунохимическая характеристика антигенного состава мочи беременных с гестозами

Антигены в моче	Метод исследования	Гестозы * (N = 147)		Здоровые* беременные(N = 50)	
		Абс.	%	абс	%
Альбумин,	ИДА	84	57,1	4	8,0
ПЩФ	ИФА	136	92,5	2	4,0
Лактоферрин	ИФА	129	87,8	6	12,0
Церуллоплазмин	ИФА	101	68,7	17	34,0
СРП	ИД	38	25,8	2	4,0
Ig A	РИД	13	8,9	0	0
IgG	РИД	32	21,8	1	2,0

Примечание. *, $p < 0,001$.

Таблица 2

Обнаружение щелочной фосфатазы в моче беременных

ЩФ в моче	Гестозы Е *(N = 56)		Здоровые* беременные (n = 30)	
	Число положительных	активность $M \pm m$ ЕБ	Число положительных	активность $M \pm m$ ЕБ
Нафтилфосфат – специфическая	45	$7,3 \pm 1,4$	11	$4,8 \pm 0,6$

Примечание. *, $p < 0,001$.

Таким образом, калориметрическое исследование мочи на активность щелочной фосфатазы обладает достаточно высокой чувствительностью (80,4%), но обладает низкой специфичностью, которая составляет 30%.

При этом методом ИФА определяется ПЩФ в 96,6% случаев, со средней концентрацией $75,8 \pm 0,8$ нг/мл также синхронно с увеличением количества других белков. В контрольной группе у здоровых беременных ПЩФ выявляется в 6,7% случаев со средней концентрацией $5,2 \pm 0,5$ нг/мл.

Эти данные получены нами впервые.

Следует отметить, что появление в моче здоровых беременных ПЩФ, которая является специфическим плацентарным ферментом, в концентрациях до 20,0 нг/мл строго говоря нельзя назвать протеинурией, а возможно, является проявлением преходящих сосудистых дисфункций и плацентарной недостаточности.

Ранее лактоферрин обнаружен в эпителии ворсин плаценты, а в сыворотке пуповинной крови лактоферрин определяется в количестве до 9000 нг/мл [2]. Высокое содержание лактоферрина в плаценте и пуповинной сыворотке позволяет предположить то, что плацента может служить источником повышения ЛФ в сыворотке крови беременных и в моче в ходе увеличения срока беременности. По нашим данным лактоферрин в моче беременных (здоровых и страдавших гестозом) обнаруживается в 95,7%. Однако, уровень лактоферрина колеблется от следовых количеств до выраженной гиперлактоферринурии, соответственно от нескольких десятков до нескольких тысяч нг/мл. При этом высокие количества лактоферрина в моче часто отмечаются на фоне нормального числа лейкоцитов в анализах мочи по Нечипоренко, следовательно, появление ЛФ в моче и его концентрации могут зависеть от других патогенетических причин, не связанных с лейкоцитурией, но отражающих степень выраженности патологических процессов в почках при гестозах. Эти данные также получены нами впервые и могут иметь важное диагностическое значение.

Итак, преимущества иммунохимических методов исследования мочи перед существующими в клинике стандартными методиками заключаются не только в достоверно более высокой чувствительности в диагностике общей протеинурии, но также и в возможности выявления в этой биологической жидкости отдельных белковых компонентов, определения их «паспортных» характеристик, как бы, «протеомики» мочи или селективной протеинурии.

В литературе мы не встретили аналогичных исследований изоферментов щелочной фосфатазы, лактоферрина, и других белков в моче у беременных и считаем, что полученные результаты имеют не только научную новизну, но и практическое значение для диагностики и оценки патогенетических механизмов нефропатии при токсикозах беременности.

Мы провели динамическое исследование мочи 87 здоровых (на момент исследования) беременных и определяли методом ИФА уровни плацентарной щелочной фосфатазы и лактоферрина в их суточной моче на 20-22 неделе беременности и повторно через 2 недели. Все беременные женщины наблюдались до родов и регистрировалось развитие гестозов. Из 96 женщин гестоз развился у 16. Ретроспективный анализ лабораторных данных позволил нам предложить формулу вероятности развития гестоза у беременных женщин уже на 22 неделе беременности. Прогноз – это вероятностное суждение о будущем состоянии объекта исследования. В нашем случае прогноз основан на сумме концентраций плацентарной щелочной фосфатазы и концентраций лактоферрина, определенных двукратно с интервалом в 2 недели. При таком расчете суммарная концентрация выше 16,0 нг/мл позволяет судить о возможности развития гестоза с вероятностью 75%.

Чувствительность метода [1]: ИстинноПоложительные / ИстинноПоложительные + Ложно Негативные = 75,0%.

Специфичность: Истиннонегативные / истиннонегативные + ложноположительные = 89,7%.

Таким образом, это означает: у 75,0% беременных женщин с суммарным уровнем ПЩФ и лактоферрина выше 16,0 нг/мл прогноз развития гестоза оказывается верным. Специфичность равна 89,7%. следовательно, у 89,7% пациентов, с заведомо отрицательным прогнозом, результаты теста отрицательны. Отрицательная разница в 14,7% между достоверно положительным прогнозом и достоверно отрицательным прогнозом является фактором неопределенности и в данном случае открывает возможности для введения новых прогностических признаков для повышения чувствительности.

По нашему мнению, механизмы элиминации различных белков при селективной протеинурии могут быть неоднозначными и, вероятно, обусловлены их избирательностью для того или иного маркера, включая проницаемость клубочково-канальцевого фильтра для мелких, средних и крупных белковых молекул.

Этот процесс потери с мочой белковых фракций различного тканевого и клеточного происхождения с различными важными биохимическими функциями не может не влиять негативно на изменение онкотического давления плазмы крови в сторону гипопроотеинемии, анемии, белково – ферментного дисбаланса и, вследствие этого – как на патогенез образования отеков тканей, так и на механизмы дезинтоксикации, тканевого дыхания, на устойчивость систем регуляции гемостаза, неспецифической резистентности организма и факторов гуморального и клеточного иммунитета при позднем гестозе. В конечном итоге, указанные молекулярные патохимические события в организме матери, видимо, не-

безразличны для функционирования фетоплацентарного комплекса и развития плода.

Список литературы

1. ГОСТ Р 53022.3-2008. – Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов. – 2008. – 22 с.
2. Морозова В.Т., Миронова И.И., Марцишевская Р.Л. Исследование мочи. – М.: РМАПО, 1996. – 84 с.
3. Николаев А.А., Ахушкова Л.М., Сухарев А.Е. Исследование щелочной фосфатазы в ткани плаценты при гестозах // «Фундаментальные исследования». 2013. – № 12 (часть 2). – С. 167-171.
4. Савельева Г.М., Шалина Р.И., Курцер М.А., Штабникий А.М., Куртенок Н.В., Коновалова О.В. Эклампсия в современном акушерстве // Акушерство и гинекология. 2010, № 6, С. 4-10.
5. Boeldt D.S., Hanks A.C., Alvarez R.E., Khurshid N., Balistreri M., Grummer M.A., Yi F., Bird I.M. Pregnancy programming and preeclampsia: identifying a human endothelial model to study pregnancy-adapted endothelial function and endothelial adaptive failure in preeclamptic subjects. // Adv Exp Med Biol. – 2014. – v.814. – p.27-47.
6. Immunologische Arbeitsmethoden. von Friemel H. – Berlin, 1984. – 472 p.
7. Jensen F., Wallukat G., Herse F., Budner O., El-Moussleh T., Costa S.D., Dechend R., Zenciusen A.C. Cd19+cd5+ cells as indicators of preeclampsia. // Hypertension. – 2012. – v. 59. – № 2. – p. 861–868.
8. Lambert G., Brichant J.F., Hartstein G., Bonhomme V., Dewandre P.Y. Preeclampsia: an update // Acta Anaesthesiol Belg. – 2014-v.65-№4-p.137-149.
9. Siddiqui A.H., Irani R.A., Blackwell S.C., Ramin S.M., Kellems R.E., Xia Y. Angiotensin receptor agonistic autoantibody is highly prevalent in preeclampsia: Correlation with disease severity. // Hypertension. – 2010. – v. 55. – p. 386–393.
10. Tang X., Yang F., Jia L., Yao X.Y., Yang K.X. Placental site trophoblastic tumor in the pelvic wall: a case report and review of the literature. // Indian J. Pathol Microbiol. – 2013. – v. 56. – № 3. – p. 300-312.
11. Warrington J.P., George E.M., Palei A.C., Spradley F.T., Granger J.P. Recent advances in the understanding of the pathophysiology of preeclampsia // Hypertension. – 2013. – v. 62. – № 4. – p. 11-24.