



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61B 5/145 (2021.08); G01N 33/53 (2021.08)

(21)(22) Заявка: 2021117642, 15.06.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
15.06.2021

Дата регистрации:  
22.03.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 15.06.2021

(45) Опубликовано: 22.03.2022 Бюл. № 9

Адрес для переписки:

654005, Кемеровская обл., г. Новокузнецк, пр.  
Строителей, 5, НГИУВ - филиал ФГБОУ ДПО  
РМАНПО Минздрава России, патентный  
отдел

(72) Автор(ы):

Бичан Николай Андреевич (RU),  
Рублевская Алина Сергеевна (RU),  
Осокина Валентина Родионовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение  
дополнительного профессионального  
образования "Российская медицинская  
академия непрерывного профессионального  
образования" Министерства  
здравоохранения Российской Федерации  
(ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава  
России) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: RU 2380705 C1, 27.01.2010. RU  
2743851 C1, 26.02.2021. СТОРОЖАКОВ Г.И.  
и др. Эндотелиальная дисфункция при  
артериальной гипертензии / Лечебное дело,  
2005, 4, с. 58-64. CHELCHOWSKA M. et al.  
Influence of Active Exposure to Tobacco Smoke  
on Nitric Oxide Status of Pregnant Women / Int.  
J. Environ. Res. Public Health, 2018, 15, 2719, 14  
pages. (см. прод.)

### (54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ У КУРЯЩИХ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИЕЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к внутренним болезням, кардиологии, акушерству и гинекологии. Способ диагностики эндотелиальной дисфункции у курящих беременных женщин с артериальной гипертензией включает забор венозной крови из периферической вены в количестве 3 мл в пробирки без наполнителей IMPROVACUTER. Для проведения анализа используют набор реагентов RayBio Human eNOS ELISA Kit. Методом ИФА измеряют уровень NO-синтазы.

Далее проводят оценку NO-синтазы. При значении NO-синтазы более 1,3 нг/мл уровень оценивают как нормальный, а при значениях NO-синтазы менее 1,3 нг/мл диагностируют эндотелиальную дисфункцию и рекомендуют коррекцию гипотензивной терапии. Способ позволяет внедрить индивидуализацию терапии артериальной гипертензии у курящих беременных за счет предварительного выявления показаний к данной терапии. 2 пр., 1 табл.

(56) (продолжение):

ZAWIEJSKA A. et al. Concentrations of endothelial nitric oxide synthase, angiotensin-converting enzyme, vascular endothelial growth factor and placental growth factor in maternal blood and maternal metabolic status in pregnancy complicated by hypertensive disorders / *Journal of Human Hypertension*, 2014, 28, pages 670-676.

R U 2 7 6 7 9 2 7 C 1

R U 2 7 6 7 9 2 7 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*G01N 33/53* (2006.01)  
*A61B 5/145* (2006.01)

## (12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

*A61B 5/145 (2021.08); G01N 33/53 (2021.08)*

(21)(22) Application: **2021117642, 15.06.2021**

(24) Effective date for property rights:  
**15.06.2021**

Registration date:  
**22.03.2022**

Priority:

(22) Date of filing: **15.06.2021**

(45) Date of publication: **22.03.2022 Bull. № 9**

Mail address:

**654005, Kemerovskaya obl., g. Novokuznetsk, pr.  
Stroitelej, 5, NGIUV - filial FGBOU DPO  
RMANPO Minzdrava Rossii, patentnyj otdel**

(72) Inventor(s):

**Bichan Nikolaj Andreevich (RU),  
Rublevskaya Alina Sergeevna (RU),  
Osokina Valentina Rodionovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethoe  
obrazovatelnoe uchrezhdenie dopolnitelnogo  
professionalnogo obrazovaniya "Rossijskaya  
meditsinskaya akademiya nepreryvnogo  
professionalnogo obrazovaniya" Ministerstva  
zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii  
(FGBOU DPO RMANPO Minzdrava Rossii)  
(RU)**

## (54) METHOD FOR DIAGNOSING ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN SMOKING PREGNANT WOMEN WITH ARTERIAL HYPERTENSION

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine, namely to internal diseases, cardiology, obstetrics and gynecology. Method for diagnosing endothelial dysfunction in pregnant smokers with arterial hypertension involves venous blood sampling from a peripheral vein in amount of 3 ml into test tubes without IMPROVACUTER fillers. RayBio Human eNOS ELISA Kit is used for the analysis. Level of NO-synthase is measured by ELISA. Further, NO-synthase

is assessed. If the value of NO-synthase is more than 1.3 ng/ml, the level is considered to be normal, and if the value of NO-synthase is less than 1.3 ng/ml, endothelial dysfunction is diagnosed and correction of the antihypertensive therapy is recommended.

EFFECT: method allows introducing individualization of therapy of arterial hypertension in pregnant smokers due to preliminary detection of indications for this therapy.

1 cl, 2 ex, 1 tbl

Изобретение относится к медицине, а именно внутренним болезням, кардиологии, акушерству и гинекологии, и может быть использовано для оценки эндотелиальной дисфункции у курящих беременных.

Артериальная гипертония (АГ) - состояние, при котором у беременных регистрируется САД  $\geq 140$  мм.рт.ст. и/или ДАД  $\geq 90$  мм.рт.ст. Известно, что в течение последнего десятилетия АГ и ассоциированные с ней осложнения занимают 4-е место в структуре причин материнской смертности. Поданным The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO, 2016) АГ регистрируется у 5-10% беременных. Распространенность АГ в РФ у беременных составляет 7-30%. По данным регистра беременных "БЕРЕГ", гипертензивные нарушения регистрировались у 14% женщин, а учитывая данные ВОЗ, гипертензивные состояния при беременности в 2014 г занимали 2-е место в структуре материнской смертности и являлись причиной не менее 76 тыс.случаев материнской и 500 тыс.случаев младенческой смертности ежегодно (2018 ЕОК рекомендации по диагностике и лечению сердечно-сосудистых заболеваний во время беременности. Рабочая группа по лечению сердечно-сосудистых заболеваний при беременности европейского общества кардиологов (ЕОК, ESC) /V.Regitz-Zagrosek, J. W. Roos-Hesselink, J. Bauersachs и др. // Российский кардиологический журнал. - 2019. - Т. 24, №6. - С. 151-228).

АГ во время беременности является причиной множества осложнений, таких как: плацентарная недостаточность; синдром задержки роста плода (СЗРП); антенатальная гибель плода; перинатальная смертность; преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты; акушерские кровотечения; эклампсия; HELLP-синдром; ДВС-синдром; острое почечное повреждение; отек легких; нарушения мозгового кровообращения (ОНМК); - кровоизлияние и отслойка сетчатки (Артериальная гипертония у беременных: взгляд с позиций европейских рекомендаций 2018 года / Е.В. Ших, О.В. Жукова, О.Д. Остроумова и др. // Артериальная гипертония. - 2019. - Т. 25, №1. - С. 105-115).

Известно, что курение является модифицируемым фактором риска АГ.

Но при этом распространенность курения остается крайне высокой, составляя в возрастной группе женщин 14-25 лет - 18,3%, а в группе 25-44 - 22,1%, несмотря на ее существенное снижение в сравнении с 2009 годом по данным глобального опроса взрослого населения о потреблении табака (GATS) (Защита здоровья женщин от воздействия табачного дыма, профилактика и лечение потребления табака и табачной зависимости у женщин [Электронный ресурс]: методические рекомендации. - Москва, 2018. - 48 с. - URL: <http://pichaevskaya-crb.ru/download/145692>).

По данным Олиной А.А. и Кузиной О.А. распространенность курения среди женщин до беременности составила 24,3-28,87%. При этом зафиксировано, что 8,8% пациенток отказались от курения, когда узнали о беременности, а, значит, ранние сроки эмбриогенеза у данной категории беременных женщин проходили на фоне никотиновой интоксикации (Олина А.А. Частота табакокурения среди беременных и связь с акушерскими осложнениями / А.А. Олина, Т.А. Метелева// Пермский медицинский журнал. - 2015. - Т. 32, №3. - С. 93-98.; О распространенности активного и пассивного курения при беременности / О.А. Кузина, О.Д. Константинова, Л.М. Демина, А.С. Волкова // Лечение и профилактика. - 2017. - №2. - С. 35-37).

Курение и артериальная гипертония непосредственно связаны с повреждением эндотелия, а именно эндотелиальной дисфункцией (ЭД). Под дисфункцией эндотелия понимают стойкое изменение структуры и/или функциональной активности эндотелия, приводящее к нарушению регуляции сосудистого тонуса, тромбозу и другим

осложнениям.

При ЭД будет нарушаться работа фермента эндотелиальной NO-синтазы (eNOS3), которая является основным источником оксида азота. В свою очередь оксид азота является основным вазодилатирующим фактором. При отсутствии повреждения основной источник оксида азота (и его метаболитов) — eNOS3. Одним из биохимических методов дисфункции эндотелия является оценка уровня эндотелиальной NO-синтазы (Власов Т.Д. Дисфункция эндотелия. Правильно ли мы понимаем этот термин? / Т.Д. Власов, Н.Н. Петрищев, О.А. Лазовская// Вестник анестезиологии и реаниматологии. - 2020. - Т. 17, №2. - С. 76-84.).

Однако до сих пор не разработаны критерии оценки эндотелиальной дисфункции у курящих беременных с артериальной гипертонией, а также подходы к ее коррекции.

Существует способ диагностики эндотелиальной дисфункции, основанный на цитометрии циркулирующих десквамированных эндотелиоцитов. Способ основывается на визуальной оценке морфологии циркулирующих десквамированных эндотелиоцитов путем фазово-контрастной микроскопии. Для проведения анализа венозная кровь в объеме 4-5 мл отбирается в пробирки, в качестве стабилизатора используется 3,8% раствор цитрата натрия. Принцип метода базируется на выделении эндотелиоцитов вместе с тромбоцитами. Тромбоциты отделяются путем добавления раствора АДФ, перемешивания смеси в течение 10 мин и центрифугирования (1000 оборотов, 10-15 мин). Бестромбоцитарная плазма осторожно отделяется от осажденных тромбоцитов и повторно центрифугируется (1000 оборотов, 20 мин). Полученная надосадочная жидкость сливается и к осадку добавляется 0,1 мл 0,9% раствора натрия хлорида. Подсчет количества клеток эндотелия осуществляется в двух сетках камеры Горяева с последующим пересчетом на 100 мл плазмы с учетом объема камеры Горяева и изменения концентрации плазмы в процессе проведения вышеописанной методики. Цитологические препараты исследовались под микроскопом LeikaDM 1000 с компьютерной видеопроставкой для обработки и анализа изображений. Проводилось определение следующих цитометрических параметров десквамированных эндотелиоцитов: средний диаметр клетки, средний периметр клетки, средняя площадь клетки, фактор формы, поляризация клетки.

Недостатками данного метода являются: трудоемкость, необходимость наличия дорогостоящего оборудования и квалифицированных специалистов, а также длительность проведения процедуры (Оценка степени тяжести эндотелиальной дисфункции при осложнениях беременности / А.В. Миронов, А.М. Торчинов, М.М. Умаханова и др. // Трудный пациент. - 2018. - Т. 16, №8-9. - С. 30-36.).

В качестве прототипа выбран способ диагностики эндотелиальной дисфункции, сущностью которого является определение концентрации оксида азота, эндотелиальной и индуцибельной NO-синтазы, а также котинина в сыворотке крови иммуноферментными методами (ELISA) с использованием моноклональных антител. Материалом для исследования служила венозная кровь в количестве 3 мл, взятая у пациенток в день поступления в стационар. Критериями включения в исследуемую группу были: курящие на протяжении всей беременности женщины, стаж курения до беременности не менее 2-х лет, имеющие срок гестации более 37 недель, одноплодную беременность. Женщины, имеющие заболевания, такие как гестационный сахарный диабет, гипертония, преэклампсия, преждевременные роды, активный гепатит, почечные и сердечно-сосудистые заболевания, а также те, у кого были осложнения при родах и длительные роды или беременность с помощью методов вспомогательной репродукции, не были включены в исследование. Многоплодная беременность, употребление алкоголя, и

пациентки, соблюдающие вегетарианскую диету, также являлись критериями исключения. Группу контроля составили женщины, включенные с учетом вышеперечисленных критериев, за исключением курения и пассивного воздействия табачного дыма. (Influence of Active Exposure to Tobacco Smoke on Nitric Oxide Status of Pregnant Women Magdalena Chelchowska, Jadwiga Ambroszkiewicz, Joanna Gajewska et al. /IntFEnvironResPublicHealth. - 2018. - Dec 3;15(12):2719).

К недостаткам данного метода относятся:

- 1) ограниченная выборка пациентов (критерием исключения являлась гипертония у беременных женщин, гестационный срок более 37 нед),
- 2) высокая стоимость диагностических методов.

Назначение настоящего изобретения - выявление эндотелиальной дисфункции с целью повышения терапевтического эффекта лечения курящих беременных пациенток с артериальной гипертонией за счет воздействия на патогенетическое звено - эндотелиальную дисфункцию.

Назначение изобретения достигается способом диагностики эндотелиальной дисфункции у курящих беременных женщин с артериальной гипертонией. Проводят забор венозной крови из периферической вены в количестве 3 мл в пробирки без наполнителей IMPROVACUTER, для проведения анализа используют набор реагентов RayBio Human eNOS ELISA Kit. Методом ИФА измеряют уровень NO-синтазы, далее проводят оценку NO-синтазы, при значении NO-синтазы более 1,3 нг/мл уровень оценивают, как нормальный, а при значениях NO-синтазы менее 1,3 нг/мл диагностируют эндотелиальную дисфункцию и рекомендуют коррекцию гипотензивной терапии.

Определение низких значений NO-синтазы указывает на высокий риск развития осложнений, как со стороны матери, так и со стороны плода. Коррекция (лечение) эндотелиальной дисфункции во время беременности позволит снизить риск данных осложнений.

Новизна способа:

- 1) Определение NO-синтазы у беременных с хронической артериальной гипертонией, у курящих беременных с хронической артериальной гипертонией.
- 2) Определение критического уровня NO-синтазы  $\leq 1,3$  нг/мл, ассоциированного с наличием АГ и эндотелиальной дисфункцией у курящих беременных.
- 3) Определение показаний для лечения бета-адреноблокатором III-го поколения с модуляцией синтеза оксида азота.

Совокупность существенных признаков изобретения позволяет получить новый технический результат, а именно, внедрить индивидуализацию терапии артериальной гипертензии у курящих беременных за счет предварительного выявления показаний к данной терапии. Выявление эндотелиальной дисфункции у курящих беременных с артериальной гипертонией требует персонифицированного лечения, а именно, назначение бета-адреноблокаторов III-го поколения.

Способ осуществляют следующим образом. При клиническом обследовании беременных используют общепринятые методы: жалобы, сбор анамнеза, а именно, длительность артериальной гипертензии, максимальные и адаптированные значения артериального давления, принимаемые препараты до/во время беременности, терапевтический эффект от принимаемых гипотензивных препаратов, стаж курения, количество выкуриваемых сигарет до/во время беременности, расчет индекса курильщика; осмотр, лабораторные исследования.

Для оценки эндотелиальной дисфункции пациенткам всех клинических групп проводят забор венозной крови из периферической вены в количестве 3 мл в пробирки без

наполнителей IMPROVACUTER. Допускают хранение пробирок в холодильном шкафу при температуре от +3 до +5°C не более 24 часов.

Для проведения анализа используют набор реагентов RayBio Human eNOS ELISA Kit. Для подготовки к хранению реагентов и проведения ИФА используют инструкцию производителя из набора (<https://doc.raybiotech.com/pdf/Manual/ELH-ENOS.pdf>)

Далее проводят оценку NO-синтазы: при значениях >1,3 нг/мл уровень оценивают как нормальный, при снижении значения NO-синтазы ≤1,3 нг/мл диагностируют эндотелиальную дисфункцию и рекомендуют коррекцию гипотензивной терапии.

В зависимости от наличия/отсутствия артериальной гипертензии и курения пациентки были разделены на 4 группы: 1) АГ, 2) АГ + курение, 3) курение, 4) без исследуемых факторов (контроль). Предлагаемый способ апробирован в клинической практике на 126 пациентах. В исследование вошли 1) пациентки с АГ (n=40), 2) пациентки курение + АГ (n=21), 3) курение (n=37), 4) контроль (n=28).

Для определения взаимосвязи АГ и концентрации NO-синтазы у курящих беременных применялась логистическая регрессия - таблица 1, где В - это коэффициенты уравнения логистической регрессии, W - значение статистики Вальда, р - статистическая значимость взаимосвязи указанной переменной с наличием АГ, ОШ - отношение шансов, характеризующее силу взаимосвязи, приведено непосредственно отношение шансов и его доверительный интервал.

Таблица 1

**Результаты логистического регрессионного анализа взаимосвязи АГ и концентрации NO-синтазы у курящих беременных женщин**

| Переменные | В    | W   | р    | ОШ[95%ДИ]      |
|------------|------|-----|------|----------------|
| NO-синтаза | -1,2 | 3,7 | 0,05 | 0,3[0,09-0,99] |
| Константа  | 1,58 | 0,7 | 0,39 | -              |

Отношение шансов менее 1 свидетельствует о протективной роли уровня NO-синтазы, другими словами, наличие АГ у курящих беременных ассоциировано с пониженным уровнем NO-синтазы.

С помощью логистической регрессии выявлено, что уровень NO-синтазы ≤ 1,3 нг/мл статистически значимо ассоциирован с наличием АГ, а значит, эндотелиальной дисфункцией, у курящих беременных.

При снижении значения NO-синтазы менее 1,3 нг/мл диагностируют эндотелиальную дисфункцию и рекомендуют смену гипотензивной терапии в пользу бета-адреноблокатора III-го поколения с модуляцией синтеза оксида азота.

**Клинический пример 1.**

Пациентка В.М, 37 лет, находилась на госпитализации в отделении патологии беременных с диагнозом: Беременность 25нед 3 дня. Первородящая. Хроническая артериальная гипертензия, существующая до беременности, достигнут целевой уровень АД. Ожирение 3 степени. Диффузный узловый зоб 2 степени.

Анамнез жизни: Диагноз "гипертоническая болезнь" установлен с 27 лет, до беременности принимала препараты группы ИАПФ (периндоприл 4 мг 1р/сут утро). На фоне гипотензивной терапии достигнуты целевые значения АД (120-130/80 мм.рт.ст.). Во время предгравидарной подготовки препараты ИАПФ заменены на БАБ (бисопролол 5 мг 1р/сут утро). В течение беременности на фоне приема бисопролола

5 мг 1р/сут утро АД в пределах целевых значений (120-130/80 мм.рт.ст.). Курение в течение 14 лет, ранее выкуривала 7-10 сигарет в сутки, с наступлением беременности снизила до 1-2 сигарет в сутки. ИПЛ равен 4,9.

Пациентке проведен забор венозной крови из периферической вены в количестве 3 мл. Методом ИФА проведено определение эндотелиальной NOS, которая оказалась равная 0,4 нг/мл, что 3 раз меньше нормативного значения 1,3 нг/мл. Таким образом, констатирована выраженная эндотелиальная дисфункция. В связи с чем пациентке была произведена замена бисопролола на небиволол - бета-адреноблокатор III-го поколения с модуляцией синтеза оксида азота.

Через 4 недели лечения небивололом 5 мг/сут пациентке вновь проведено исследование NO-синтазы, которая повысилась до 1,5 нг/мл, что свидетельствует о нормализации функции эндотелия, а следовательно уменьшения риска развития перинатальных осложнений.

Клинический пример 2.

Пациентка В.С, 28 лет, госпитализирована в отделение патологии беременности с диагнозом: Беременность 37 нед. ОАГА. Тазовое предлежание плода. Артериальная гипертензия, существующая до беременности. Бактериальный вагиноз. ВПР: Расщелина нижней губы и неба. Ожирение 2 ст.

Анамнез жизни: Диагноз "гипертоническая болезнь" установлен в течение 1 года. До беременности медикаментозную терапию не получала, целевые значения АД (120-130/80 мм.рт.ст.) достигнуты на фоне немедикаментозных методов лечения. С 7 недель настоящей беременности зафиксировано повышение артериального давления с максимальными значениями 170/110 мм.рт.ст. В настоящее время принимает метилдопа (допегит) 250 мг 3 р/сут, бисопролол (конкор) 2,5 мг 1 р/сут утром. На фоне медикаментозной терапии достигнуты целевые значения АД (120-130/80 мм.рт.ст.). Вредные привычки отрицает.

Пациентке проведен забор венозной крови из периферической вены в количестве 3 мл. Методом ИФА проведено определение эндотелиальной NOS, которая оказалась равной 1,8 нг/мл, что больше нормативного значения 1,3 нг/мл. Таким образом, у данной пациентки отсутствуют лабораторные признаки эндотелиальной дисфункции, а следовательно, она не нуждается в коррекции медикаментозной терапии.

#### (57) Формула изобретения

Способ диагностики эндотелиальной дисфункции у курящих беременных женщин с артериальной гипертонией, включающий забор венозной крови и определение NO-синтазы, отличающийся тем, что проводят забор венозной крови из периферической вены в количестве 3 мл в пробирки без наполнителей IMPROVACUTER, для проведения анализа используют набор реагентов RayBio Human eNOS ELISA Kit, методом ИФА измеряют уровень NO-синтазы, далее проводят оценку NO-синтазы, при значении NO-синтазы более 1,3 нг/мл уровень оценивают как нормальный, а при значениях NO-синтазы менее 1,3 нг/мл диагностируют эндотелиальную дисфункцию и рекомендуют коррекцию гипотензивной терапии.