

## 2.2. Методы исследований

Во всех группах, включая контрольные, проводилось эпидемиологическое обследование с применением анкетирования с учетом биологических, социальных и анамнестических данных и общеклиническое, инструментальное и лабораторное обследование.

При общеклиническом обследовании все женщины подвергались гинекологическому исследованию с применением тестов функциональной диагностики (кольпоцитология, измерение базальной температуры), по показаниям – кольпоскопии и онкоцитологическому исследованию. Также все больные были осмотрены терапевтом, эндокринологом, невропатологом, окулистом с исследованием глазного дна и ЛОР-врачом.

**Инструментальное обследование** включало:

1. Ультразвуковое исследование органов малого таза.

УЗИ органов малого таза проводилась на аппаратах «Aloka-650» с абдоминальным датчиком 3,5 МГц, или «Aloka SSD-500-Micrus» с абдоминальным конвексным датчиком 3,5 МГц и трансвагинальным датчиком 5,0 МГц. Объем яичников вычислялся по формуле (Медведев М.В., Митьков В.В., 1997):

$$U = L \times H \times F \times 0,52, \text{ где}$$

L – длина яичника, F – толщина яичника, H – высота яичника, 0,52 – коэффициент,

2. Рентгенологическое исследование костей черепа.

Для исключения объемных процессов гипоталамо-гипофизарной области всем больным проводилась обзорная рентгенография черепа и прицельный снимок области турецкого седла. Боковая краниография проводилась с использованием рентген-аппарата «РУМ – 20 М».

3. Электроэнцефалография .

Для подтверждения диагноза: Гипоталамический синдром 100%

больным проводилась ЭЭГ головного мозга на 16-ти канальном электроэнцефалографе «EEG-16-S».

#### **Лабораторные исследования:**

##### **1. Гормональное обследование.**

Гормональное обследование включало определение базальных значений – ПРЛ, ЛГ, ФСГ, ТТГ, эстрадиола, прогестерона, тестостерона и кортизола методом иммуноферментного и радиоиммунологического анализа с использованием анализатора «Cobos EIL» (Швейцария) и тест-систем «Диа-Плюс» – «Рош-Москва» и анализатора «RIA-Gamma» (Швеция) и наборов реагентов CIS-BIO International (Франция). Забор крови для гормональных исследований осуществлялся натощак, с 8 до 9 часов утра, с 5 по 9 день менструального цикла, на 20-21 дни (для определения прогестерона) или на фоне задержки menses не менее чем на 3 месяца.

##### **2. Определение продуктов свободнорадикального окисления липидов и активности антиоксидантных систем.**

###### **1). Определение малонового диальдегида (МДА).**

В основе используемого метода лежит реакция между малоновым диальдегидом и тиобарбитуровой кислотой, в результате которой при высокой температуре в кислой среде образуется окрашенный триметиновый комплекс с максимумом поглощения при длине волны 532 нм. Для определения МДА использована методика Yagi e.a. (1968) в модификации Yagi Y. e.a. (1976), преимущество которой заключается в том, что она позволяет существенно уменьшить интенсивность поглощения при 450 нм, затрудняющего регистрацию продуктов ПОЛ спектрофотометрически при длине волны 532 нм. Согласно методике производили обработку проб смесью 0,67% водного раствора ТБК и ледяной уксусной кислоты (1 : 1 по объему), а для депроитизации

образцов применяли хлороформ. Для расчета количества МДА использовали молярный коэффициент экстинкции этого комплекса  $1,56 \times 10^5$  см<sup>2</sup> х м. Выражали содержание МДА в мкМ/мл.

## 2). Определение диеновых конъюгатов.

Принцип метода основан на интенсивном поглощении конъюгированных диеновых структур гидроперекисей липидов в области 232-234 нм (Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И., 1983). Материалом для исследования служила плазма крови, в качестве стабилизатора использовался раствор этилендиаминтетраацетата (ЭДТА), содержащий ЭДТА 1 мг/мл, как ингибитор свободнорадикального окисления липидов.

Содержание диеновых конъюгатов выражали в относительных единицах на 1 мл плазмы по формуле:

$D_{233} \times V_{\text{э}} / V_{\text{п}} = D_{233} \times 20$ , на 1 мл плазмы, где

$D_{233}$  – измеренное значение оптической плотности,

$V_{\text{э}}$  – 4 мл – конечный объем гептанового экстракта,

$V_{\text{п}}$  – 0, 2 мл – объем взятой плазмы крови.

## 3). Оценка антиокислительной активности (АОА) плазмы крови.

Для оценки АОА плазмы (в %) использовали модельную систему, представляющую собой суспензию липопропротеидов желтка куриных яиц, согласно методике Клебанова Г.И., Бабенковой И.В., Теселкина Ю.В., с соавт. (1988), позволяющей оценить способность плазмы крови тормозить накопление ТБК-активных продуктов в суспензии желточных липопропротеидов. ПОЛ в пробах индуцировали добавлением раствора  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , причем контрольная проба не содержала плазмы крови.

## 4). Флуорометрический метод определения альфа-токоферола.

Использовали метод Taylor S.L. e.a. (1976), который предусматривает удаление веществ, препятствующих определению путем омыления проб в

присутствии больших количеств аскорбиновой кислоты, экстракцию неомыляющихся липидов гексаном с последующим флуорометрическим определением содержания альфа-токоферола. Измерения производили на флуоресцентном спектрофотометре Hitachi F-3000 при максимуме возбуждения 286 нм и излучения – 330 нм. В качестве внешнего стандарта использовали D, L-, альфа-токоферол (Serva). Концентрацию биоантиоксиданта рассчитывали путем сравнения интенсивности флуоресцентности проб и внешнего стандарта после коррекции на флуоресценцию контроля реактивов и выражали в мкМ/л.

5). Активность каталазы определяли по методу А.Баха и Н. Зубковой (Асатиани В.С., 1969) и выражали в М/л · мин.

6). Определение пероксидазной активности крови.

Пероксидазную активность крови определяли на основе фотометрической регистрации снижения концентрации индигокармина, который окисляется перекисью водорода в присутствии пероксидазы. Расчет пероксидазной активности крови производили по формуле:

$E \cdot 571,428$ , где

E- разность между оптической плотностью контроля и опыта, 571,428- коэффициент и выражали в мМ/л·мин (Попов Т., Нейковска Л., 1971).

3. Исследование показателей элементного состава сыворотки крови.

Содержание в сыворотке крови Fe, Cu, Zn, Ca, Mn, K, Na изучали с использованием метода атомно-абсорбционной спектрометрии (на атомно-абсорбционном спектрофотометре ААС-40, Германия) по методике, предложенной И.Хавезовым и Д. Цалевым (1983).

4. Иммунологическое исследование.

Для оценки состояния иммунитета проводились следующие тесты: определение относительного и абсолютного числа лимфоцитов в периферической крови, тесты Т- и ЕАС–розеткообразования для

определения относительного и абсолютного числа Т- и В-лимфоцитов крови, определение (по Манчини с соавт.) концентрации сывороточных иммуноглобулинов основных классов (М, G, А), определение фагоцитарной активности лимфоцитов (по Patterson-Delafierd J., Lehrer R. J., 1977), выявление циркулирующих в крови иммунных комплексов (Петров Р.В., Лопухин Ю.М., Чередеев А.Н. с соавт., 1984).

#### 5. Методы генетического исследования.

В работе исследовались распределение частот аллелей локуса  $A_{\rho}B$  3'HVR, обнаруженных в генотипах больных ГС и девушек и женщин контрольных групп. Для выделения ДНК применялся набор реагентов с использованием сорбента и раствора гуанидинтиоцианата («Биосан», Новосибирск). ДНК выделялась из замороженных образцов форменных элементов крови, отделенных от сыворотки центрифугированием. Полимеразная цепная реакция проводилась в термоамплификаторе «Technе» РНС-2. Продукты амплификации анализировались в 6% полиакриламидном геле. Визуализация обеспечивалась этидиум бромидом на УФ-трансиллюминаторе. Для определения аллелей использовался маркер молекулярного веса лямбда ДНК/EcoRI, Hind III (MBI Fermentas), набор аллелей  $a_{\rho}B$  и pYNZ 22.

#### 6. Сканирующая электронная микроскопия эритроцитов периферической крови.

На этапе разработки комплексного метода лечения больных гипоталамическим синдромом с внутривенным введением раствора гипохлорита натрия, полученного электрохимическим путем, для изучения поверхностной цитоархитектоники эритроцитов периферической крови использовался метод сканирующей электронной

микроскопии. Образцы готовили по методике В.Я.Карупу (1984), материал изучали на растровом электронном микроскопе BS-300 (Чехословакия). Для анализа морфологических форм эритроцитов использовалась классификация Г.Козинец и Ю.Симоварт (1984). В каждой пробе проводился подсчет различных форм эритроцитов из 1000 просмотренных клеток с последующей статистической обработкой.