

На правах рукописи

КОЛОДЕЙ Елена Николаевна

**ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ХРОНИЧЕСКИХ
ЗАБОЛЕВАНИЙ ТОЛСТОЙ КИШКИ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ
ХРОМАТОГРАФИИ СЫВОРОТКИ КРОВИ**

14. 01. 04 – внутренние болезни

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Казань – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры госпитальной терапии им. В.Г.Вогралика ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации Алексеева Ольга Поликарповна.

Официальные оппоненты:

Низов Алексей Александрович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой внутренних болезней и поликлинической терапии ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П.Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Кашкина Елена Игоревна – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры госпитальной терапии лечебного факультета ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И.Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

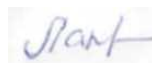
Ведущая организация – ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «__» 2018 г. в ____ часов на заседании объединенного диссертационного совета Д 999.190.02 при ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России и ФГБОУ ВО ПИМУ Минздрава России (420012 Казань, ул. Бутлерова, 49).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке (420012, Казань, ул. Бутлерова, д 49Б) и на сайте (<http://www.kazangmu.ru>) ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России.

Автореферат разослан «__» _____ 201__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат медицинских наук, доцент



С.А.Лапшина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Распространенность хронических заболеваний толстой кишки выражена у значительной части населения. Самыми частыми из этих заболеваний являются синдром раздраженного кишечника, язвенный колит, колоректальный рак, распространенность которых увеличивается во всем мире, в том числе и в России [Алексеева О.П., 2008; Белоусова Е.А. и др., 2006; Kappelman M.D., 2008; Loftus E.V.Jr., 2004; Henderson P. et al., 2015; Халиф И.Л. и др., 2017].

В развитых странах, где заболеваемость колоректальным раком очень высока, вероятность развития этого заболевания на фоне язвенного колита возрастает в 8-30 раз. К факторам риска относятся распространенность поражения толстой кишки, длительность воспалительного процесса и, возможно, возникновение заболевания в детстве [Rubin D.C. et al., 2012; Hemminki K. et al., 2008; Katsanos K. N. et al., 2007].

Хроническое раздражение слизистой оболочки кишечника может предрасполагать к неопластическим изменениям или нарушению процесса репарации. Не исключено, что существует какой-то общий фактор, способствующий появлению как язвенного колита, так и колоректального рака. Диагностика колоректального рака на фоне язвенного колита значительно затруднена, требует инвазивного обследования и множественного забора биопсийного материала [Белоусова Е.А. и др., 2002, 2009; Халиф И.Л. и др., 2017; Baars J.E. et al., 2011].

Все вышеизложенное выдвигает необходимость непрерывного поиска новых диагностических способов язвенного колита и колоректального рака на его фоне, особенно в направлении создания высокотехнологичных способов поиска закономерностей в стохастических системах, к которым несомненно относится и организм человека.

Степень разработанности выбранной темы исследования связана с достижениями современной аналитической химии, и в частности, широко применяемой технологией высокоэффективной жидкостной хроматографии [Барам Г.И., 2005; Насонов С.В., 2008; Федорова Г.А., 2008; Захарова Е.Ю., 2012]. Она сочета-

ет высокую точность качественного и количественного анализа сложных веществ, современную автоматизацию процессов на основе высокотехнологичных вычислительных мощностей и алгоритмов статистической обработки данных, что позволяет фиксировать в крови не только уровни биологических компонентов, но и степени из соотношений [Барам Г.И., 2005; Федорова Г.А., 2008].

Высокоэффективная жидкостная хроматография позволяет проводить разделение сложной смеси на составляющие компоненты с дальнейшим выделением сверхчистых фракций веществ [Барам Г.И., 2005], которые потенциально могут быть использованы как биомаркеры в диагностике заболеваний. Это представляет собой фундаментальную задачу, которая трудно выполнима и в рамках данной работы не ставилась. В работе был использован принципиально другой подход, основанный на современных достижениях высокоэффективной жидкостной хроматографии в области объединения хроматографического анализа и статистического разграничения оптимальных итоговых оценок по теории распознавания образов [Панченков А.Н., 2005; Насонов С.В., 2007]. В результате была создана новая уникальная технология построения и анализа спектрометрических образов болезней на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови, с применением которой разработаны способы диагностики и дифференциальной диагностики заболеваний [Насонов С.В., 2007, 2009; Миронов Н.Н., 2008].

Цель работы: изучить возможности дифференциальной диагностики синдрома раздраженного кишечника, язвенного колита и колоректального рака, а также скрининга дисплазии слизистой оболочки толстой кишки, возникшей на фоне язвенного колита с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови и формированием спектрометрических образов болезней.

Задачи:

1. Изучить возможность дифференциальной диагностики язвенного колита и синдрома раздраженного кишечника с использованием технологии построения

и анализа спектрометрических образов болезней на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови.

2. Оценить количественные закономерности спектрометрических образов, построенных на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови, с целью проведения дифференциальной диагностики между язвенным колитом и раком толстой кишки.

3. Исследовать возможность скрининга дисплазии слизистой оболочки толстой кишки у больных язвенным колитом с формированием спектрометрических образов на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови.

Научная новизна работы заключается в выявлении новых закономерностей в изменении спектрометрических показателей сыворотки крови при язвенном колите без дисплазии и с развитием дисплазии слизистой оболочки, синдроме раздраженного кишечника, раке толстой кишки, что может служить основой для скрининга и дифференциальной диагностики.

Впервые показана перспективная возможность использования технологии построения и оценки спектрометрических образов болезней на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови с целью дифференциальной диагностики язвенного колита с синдромом раздраженного кишечника и колоректальным раком.

Впервые установлена возможность скрининга потенциальной дисплазии слизистой оболочки толстой кишки, как облигатно предракового состояния, у больных язвенным колитом с применением технологии построения и оценки спектрометрических образов на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Теоретическая значимость работы заключается в дальнейшем развитии основных подходов к дифференциальной диагностике и вопросам скрининга воспалительных заболеваний кишечника в направлении разработки новых способов построения спектрометрических образов болезней на основе теории распознавания

образов в стохастических системах по аналогии идеи создания искусственного интеллекта.

В результате выполненных исследований предложена методика дифференциальной диагностики наиболее часто встречающихся заболеваний толстого кишечника: язвенного колита и синдрома раздраженного кишечника, язвенного колита и рака толстой кишки, а также скрининга потенциальной дисплазии слизистой оболочки толстой кишки на фоне язвенного колита с применением технологии построения и оценки их спектрометрических образов на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови.

Сформирована по типу «обучающей выборки» пополняемая специальная база данных спектрометрических образов по сыворотке крови для больных язвенным колитом с дисплазией и без дисплазии слизистой оболочки толстой кишки, которая направлена на совершенствование точности скрининга потенциальной дисплазии слизистой толстой кишки у больных язвенным колитом.

Методология и методы исследования.

Методология исследования заключалась в комплексе мероприятий, направленных на построение спектрометрических образов болезней посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови. Сравнение и анализ найденных спектрометрических образов были направлены на выявление возможности дифференциальной диагностики воспалительных заболеваний кишечника, в частности, синдрома раздраженного кишечника, язвенного колита и колоректального рака, а также скрининга дисплазии слизистой оболочки толстой кишки, возникшей на фоне язвенного колита.

Перечень использованных методов исследования позволял проводить верификацию заболеваний и включал стандартные клинические методы диагностики для формирования однородных и сопоставимых групп больных (илеоколоноскопия с биопсией, гистологические и общеклинические исследования), выполнение высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови с последующей многоуровневой статистической обработкой исходных данных для итогового построения спектрометрических образов болезней.

Положения, выносимые на защиту:

1. Для дифференциальной диагностики язвенного колита и наиболее распространенных заболеваний толстой кишки: колоректального рака и синдрома раздраженного кишечника может быть использована технология построения и анализа спектрометрических образов болезней на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови.

2. Технология построения и анализа спектрометрических образов болезней на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови позволяет проводить скрининг дисплазии слизистой оболочки толстой кишки, формирующейся на фоне язвенного колита.

Степень достоверности и апробация результатов.

Степень достоверности результатов исследования определяется формированием однородных по изучаемым признакам групп больных, унификацией забора и подготовки проб сыворотки крови, стандартизацией приборного оборудования для выполнения высокоэффективной жидкостной хроматографии с последующим применением общепринятых, научно обоснованных и запатентованных способов компьютерной обработки исходных данных на основе дисперсионного и кластерного анализов с итоговым цифровым и визуальным представлением спектрометрических образов болезней, пригодных для выполнения сравнительных оценок.

Основные результаты выполненных исследований доложены и обсуждены в процессе работы 17 Российской гастроэнтерологической недели (Москва, 10-12 октября 2011 года), на региональной научно-практической конференции «Заболевания кишечника: от научных достижений к клинической практике» (Нижний Новгород, 06 декабря 2012 г.), на 13 Международном Славяно-Балтийском научном форуме «Санкт-Петербург – Гастро-2017», на межкафедральном заседании с участием кафедры пропедевтики внутренних болезней, кафедры факультетской и поликлинической терапии, кафедры госпитальной терапии им. В.Г. Вогралика и проблемной комиссии «Внутренние болезни, кардиология, токсикология, эндокринология, фармакология» ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (25 сентября 2017 года).

Внедрение результатов исследований. Основные научные положения и выводы нашли отражение в педагогическом процессе и научной работе на кафедре госпитальной терапии им. В.Г.Вогралика ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Результаты исследования внедрены в клиническую практику гастроэнтерологического центра и гастроэнтерологического отделения ГБУЗ Нижегородской области «Нижегородская областная клиническая больница им. Н.А.Семашко».

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы и списка литературы. Объем работы – 104 страницы машинописного текста. Иллюстративная часть включает 8 рисунков и 20 таблиц. Список литературы включает 133 наименования, из которых 39 работ на русском языке и 94 – на иностранном.

Публикации. По теме диссертации опубликованы 11 научных работ, 7 из которых представлены в периодических научных изданиях, рекомендованных ВАК Российской Федерации для публикации основных результатов диссертаций на соискание учёной степени кандидата.

Личный вклад автора. Вклад автора в диссертационное исследование состоит его в личном участии во всех этапах, включающих проведение обзора отечественной и зарубежной литературы, постановку целей и задач, планирование и выполнение в полном объеме исследовательской части по получению исходных данных, обработке и анализу полученных статистических выборок, формированию, представлению и интерпретации научных результатов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы. В исследованиях участвовали 108 больных, из которых 49 человек (28 мужчин и 21 женщина) составили больные язвенным колитом (основная группа), 41 пациент (19 мужчин и 22 женщины) – больные колоректальным раком (КРР), 18 человек (4 мужчины и 14 женщин) наблюдались с синдромом раздраженного кишечника. Больным проводилось стационарное и амбу-

латорное обследование и лечение на базе гастроэнтерологического и колопроктологического отделений Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Нижегородской области «Нижегородская областная клиническая больница им. Н.А.Семашко» в период с 2008 по 2013 годы. Забор крови и подготовка ее к проведению высокоэффективной жидкостной хроматографии у всех больных выполнена на этой же базе. ВЭЖХ с компьютерной обработкой проведена на экспериментальной базе ООО «Диагностические системы».

Больные язвенным колитом были в возрасте от 20 до 72 лет, имели давность заболевания от 1 до 18 лет, большинство больных (36.8%) – от 1 до 5 лет. В исследование не включались больные с тяжелой сопутствующей патологией и сопутствующими заболеваниями в стадии обострения. Среди сопутствующих заболеваний наиболее частыми были хронический гастрит (40.7%), хронический холецистит (24.5%), хронический панкреатит (16.3%), ГЭРБ (12.2%), контролируемая артериальная гипертензия (6.1%), анемия (55,1%). Анемия регистрировалась как осложнение у больных язвенным колитом и колоректальным раком.

Легкая степень тяжести (активности) язвенного колита по индексу МАУО (3-5 баллов) установлена у 6 пациентов (12.2%), средняя степень (6-10 баллов) выявлена у 32 больных (65.3%), тяжелая степень (11-12 баллов) диагностирована у 11 лиц (22.5%). У всех тяжелых больных присутствовали системные внекишечные проявления – лихорадка и артралгии.

По результатам эндоскопического обследования протяженность поражения толстой кишки определена как левосторонний колит у 26 пациентов (53%) или тотальное поражение у 23 больных (47%).

Состав группы больных колоректальным раком представлен пациентами в возрасте от 40 до 84 лет, большинство из которых (80%) старше 50 лет. Среди сопутствующих заболеваний и осложнений преобладали анемия (47.5%), хронический гастрит, хронический панкреатит вне обострения, стеатоз печени (27.5%) и гипертоническая болезнь (20%).

Больные колоректальным раком наблюдались в Нижегородском областном онкологическом диспансере и колопроктологическом отделении Нижегородской

областной клинической больницы им. Н.А.Семашко. Диагноз у всех больных подтвержден при эндоскопическом и гистологическом исследовании. Больные находились в отделениях в ожидании оперативного лечения.

По локализации патологического процесса представлены все отделы толстой кишки, наиболее часто опухоль локализовалась в прямой кишке как у мужчин, так и у женщин. По величине были выявлены опухоли от небольших размеров до более чем половины просвета кишки. Наиболее часто опухоль не превышала 5 см, прорастая только в мышечный слой (T2–T3). Регионарных и отдаленных метастазов по результатам обследования у больных не было установлено (N0M0). Такая опухоль толстой кишки соответствовала 1–2 стадии.

По морфологическим данным у 28 больных диагностирована умеренная или высокодифференцированная аденокарцинома, у 11 больных – низкодифференцированная аденокарцинома и у 1 больной – рак железистого строения.

Основными клиническими проявлениями колоректального рака более чем у половины больных были умеренная слабость, боль и вздутие живота, отмеченные у 12 пациентов. У 11 больных регистрировалась кровь в кале, у 9 больных был жидкий стул и 11 лиц беспокоил запор. Субфебрильная температура присутствовала у 3 больных.

Больные синдромом раздраженного кишечника имели более молодой возраст (до 50 лет) и меньшее число сопутствующих заболеваний: хронический гастрит (22,2%) и ГЭРБ (22.2%).

Всем больным выполнялись следующие стандартные методы обследования: лабораторные методы – общий анализ крови и мочи, уровни в сыворотке крови глюкозы, креатинина, АЛТ, АСТ, ГГТ, ЩФ, билирубина, альбумина;

электрокардиография в 12 стандартных отведениях;

ультразвуковое исследование органов брюшной полости;

рентгенография органов грудной клетки и, при необходимости, ирригоскопия;

выявление в кале *Clostridium difficile*, бактериальных патогенов и яиц паразитов по общепринятым методам диагностики;

илеоколоноскопия с оценкой эндоскопического индекса тяжести поражения слизистой оболочки толстой кишки с прицельной биопсией (от 3 до 10 биоптатов) проводилась при помощи аппарата OLYMPUS CV-170 (Япония);

морфологическое исследование биоптатов из наиболее пораженных участков слизистой оболочки толстой кишки после окраски микропрепаратов по Романовскому включало оценку гистологической активности язвенного колита и наличие (исключения) дисплазии слизистой оболочки толстой кишки с оценкой результатов гистологического исследования двумя независимыми экспертами в соответствии с Российскими рекомендациями [Ивашкин В.Т. и др., 2015].

Гистологическая активность язвенного колита устанавливалась с применением системы балльных оценок по S.N. Saverymuttu et al. (1986) с подсчетом индекса гистологической активности по суммарному количеству баллов: незначительная активность 3-4 балла, умеренная активность 5-10 баллов, выраженная активность 11-12 баллов.

Диагноз дисплазии слизистой оболочки толстой кишки оценивали на основании классификации международной группы экспертов [Thomas T. Et al., 2007] с учетом российских подходов и рекомендаций [Аруин Л.И. и др., 1998; Ивашкин В.Т. и др., 2015; Пальцев М.А. и др., 2014]. При диагностике дисплазии в биоптатах учитывались следующие изменения: увеличение размеров и полиморфизм клеточных ядер эпителиоцитов, гиперхроматизм, изменения структуры хроматина, увеличение числа ядрышек клетки и их величина, признаки активизации митоза. Биоптаты (от 3 до 10) оценивали два независимых эксперта с выдачей заключения: без дисплазии, дисплазия легкой степени, дисплазия тяжелой степени.

Диагноз язвенного колита был выставлен в соответствии с международными и Российскими рекомендациями обследования больных с учетом клинической картины, результатов эндоскопического и морфологического обследования при исключении кишечных инфекций [Ивашкин В.Т. и др., 2014].

Тяжесть язвенного колита оценивалась по количественному индексу клинической активности МАУО. Составляющими данного критерия являлись показатели частоты стула, наличия в нем крови, результаты эндоскопического обследования

ния с биопсией и оценка общего состояния врачом на момент осмотра (PGA). Показатели частоты стула и количества в нем крови оценивались по итогам личных наблюдений пациентов в течение трех дней, предшествующих оценке общего состояния врачом. Такая оценка тяжести язвенного колита является общепринятой при проведении научных исследований [Schroeder K.W. et al., 1987].

Диагноз СРК формулировали в соответствии с Римскими критериями III [Drossman D.A., 2006] – наличие рецидивирующей боли или дискомфорта в животе более трех дней в месяц в течение последних трех месяцев в сочетании с одним или более следующих факторов: уменьшение боли в животе после дефекации, изменение частоты стула, изменение характера стула (оценка по Бристольской шкале консистенции кала), метеоризм. Всем больным было проведено стандартное обследование для исключения органической патологии: общие клинические анализы крови и мочи, копрограмма, основные биохимические анализы крови, ультразвуковое исследование брюшной полости, илеофиброколоноскопия и/или ирригоскопия по общепринятым методикам.

Диагноз колоректального рака был установлен в соответствии с классификацией С.Е.Dukes (1932) и международными рекомендациями по системе TNM [Colon and rectum, 2002] по итогам тщательного обследования больного (эндоскопические, морфологические и рентгенологические визуализирующие методы диагностики).

Лечение больных проводилось в соответствии с клиническими рекомендациями и стандартами ведения взрослых больных воспалительными заболеваниями кишечника и синдромом раздраженного кишечника, принятых в Российской Федерации [Белоусова Е.А. и др., 2009; Ивашкин В.Т. и др., 2014, 2015].

ВЭЖХ – высокоточный аналитический метод, выполняющий разделение и анализ компонентов в сложных биологических смесях. В данной работе в исследуемым субстратом являлась сыворотка крови. Отбор крови проводился у пациентов натошак из локтевой вены в количестве 5-10 мл. Полученная после разделения компонентов крови сыворотка (не менее 2 мл) высушивалась до состояния сухой корочки при комнатной температуре 25°C в течение 48 часов. Затем суб-

страт перемалывался до состояния гомогенного порошка. Из навески порошкообразной сыворотки (40 мг) и в течение 45 минут выполнялась экстракция 200 мкл субстрата 85% метанолом. Цель осаждения крупно- и среднемолекулярных белков достигалась путем центрифугирования полученной смеси при ускорении 12G. После отбора надосадочной жидкости полученный экстракт сыворотки крови был пригоден для жидкостно-хроматографического исследования. В случае необходимости пробы сыворотки анализировались повторно 2-3 раза.

Анализ выполнялся по стандартной методике исследования на хроматографе «Милихром А-02» (ЗАО «Эконова», Новосибирск) [Барам Г.И., 2005; Федорова Г.А., 2008].

Почти все выявленные на хроматограмме пики являлись пептидами, олигопептидами или низкомолекулярными белками, идентификация которых в соответствии с условиями исследования не проводилась.

Далее полученная хроматограмма подлежала математической обработке с выявлением значимых пиков и расчетом их площадей. Соотношения площадей представляют безразмерные относительные пропорции уровней веществ в смеси. Они наиболее полно отражают биохимический состав исследуемого субстрата. Эти соотношения использовались в качестве параметров, подлежащих дальнейшей многоуровневой статистической обработке.

Планирование исследований и оценка результатов выполнялись по общепринятым статистическим стандартам одномерного и многомерного математического анализа.

Одномерный анализ включал определение среднего значения и среднего квадратического отклонения со стандартной ошибкой и оценку достоверности различий выборок посредством *t*-критерия Стьюдента [Лакин Г.Ф., 1990].

Количественные соотношения веществ у больных язвенным колитом, синдромом раздраженного кишечника и колоректальным раком, регистрируемые при ВЭЖХ сыворотки крови, являлись исходными данными для выделения диагностического критерия – многомерного стохастического отклика и виде «спектрометрического образа болезни».

Оценка хроматограмм сыворотки крови выполнялась на интегрированной с хроматографом ПЭВМ. Хроматограммы превращались в цифровые коды в полосах ультрафиолетового детектирования с длинами волн 200, 210, 220, 230, 240, 250 и 280 нм. Многовариантные оценки полученных параметров хроматограмм при помощи дискриминантного анализа были преобразованы в трехмерные диагностические критерии в ортогональной системе координат (X, Y, Z). По координатным осям (X, Y, Z) откладывались величины трех параметров, дающих оптимальное разграничение признаков при заданной патологии. ВЭЖХ-параметр представлял собой отношение площади одного пика ($A(J)$), при соответствующей частоте детектирования (J), к площади другого пика ($A(I)$), при такой же частоте детектирования (I).

Для статистической оценки ВЭЖХ-параметров в спектрометрических образцах болезней были применены методы многомерного статистического анализа, разработанные в рамках диалоговой системы STADIA 4.52 (копия 1102), выполненной в авторской компьютерной программе с обработкой полученных массивов хроматограмм по принципу многоуровневого кластерного и дискриминантного анализа [Насонов С.В., 2007].

Методом кластерного анализа выполнялась предварительная ориентировочная оценка однородности распределений спектрометрических параметров для выбранных образцов болезней. Далее использовался метод дискриминантного анализа, позволяющий определить канонические направления в полученном пространстве признаков по критерию максимального соотношения дисперсий в распределениях спектрометрических параметров между образцами к дисперсии внутри самих образцов. Уровень достоверности линейных дискриминантных оценок определялся по критерию хи-квадрат Фишера для 3-х степеней свободы и доверительной вероятности более 95%. Итоговым результатом оценки служил спектрометрический образ, выявленный в фиксированной точке трехмерного координатного пространства. Совокупность спектрометрических образов для отдельных пациентов составляло целостное диагностическое облако заболевания.

Сочетание высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови и компьютерной многоуровневой статистической обработки явилось уникальной комплексной технологией фиксации или построения в трехмерном пространстве спектрометрических образов для изучаемой патологии.

В качестве количественной оценкой диагностической способности изучаемых клинических тестов были выбраны стандартные показатели чувствительности, специфичности и точности. Чувствительность метода высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови устанавливали по стандартному правилу оценки вероятности выявления заданной патологии или положительных результатов в исследуемой группе больных, то есть внутригрупповые различия. Специфичность определяли по критерию отсутствия ошибочных (ложноположительных) результатов. Особенностью вычисления показателя специфичности для решения задач дифференциальной диагностики является принятие гипотезы о наличии ложноположительных результатах по соотношению их проявлений между сравниваемыми группами, то есть межгрупповые различия. Диагностическая точность устанавливалась как доля правильных результатов теста или истинных результатов среди всех обследованных больных в сравниваемых группах

Полученные результаты исследований и их обсуждение

Первая задача исследования состояла в изучение возможности выделения группы больных язвенным колитом среди других наиболее часто встречающихся заболеваний кишечника: синдрома раздраженного кишечника и колоректального рака. С этой целью проводилось сравнение групп больных язвенным колитом и синдромом раздраженного кишечника, язвенным колитом и колоректальным раком на основе технологии построения и оценки спектрометрических образов болезней с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови.

В группах пациентов с язвенным колитом и синдромом раздраженного кишечника проводился забор проб сыворотки крови с последующим жидкостно-хроматографическим анализом и построением спектрометрических образов. Конечные результаты методики были представлены в виде единичных спектрометрических образов для больных, попавших в зависимости от вида и тяжести патологии в фиксированные точки трехмерной системы координат, что обеспечивало

наглядность представления искомых показателей. Совокупность единичных спектрометрических локусов для разных пациентов с язвенным колитом составило диагностическое облако патологического состояния, которое по заданным статистическим критериям сравнивалось с аналогичным облаком больных синдромом раздраженного кишечника.

Решение задачи оценки возможности дифференциальной диагностики язвенного колита и синдрома раздраженного кишечника при помощи технологии построения и оценки спектрометрических образов на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови проводилось путем подборки группы больных язвенным колитом в фазе обострения, состоящая из 49 человек (28 мужчин и 21 женщина в возрасте от 20 до 72 лет) с точно верифицированным клиническим диагнозом. Установление и верификация диагноза проводились по стандартным методам эндоскопического и морфологического исследования.

В качестве группы сравнения обследовано 18 больных синдромом раздраженного кишечника – функционального заболевания, диагноз которого был поставлен в соответствии с Римскими критериями III [Drossman D. A., 2006] после тщательного обследования, в том числе колоноскопии с исключения органической патологии. В сравнительный анализ были включены 32 больных язвенным колитом средней тяжести и 13 больных СРК-Д (с диареей).

Конечной оценкой технологии построения и оценки спектрометрических образов являлись две выборки групп больных язвенным колитом и синдромом раздраженного кишечника, расположенные в фиксированных точках трехмерной системы координат. Совокупность спектрометрических локусов для пациентов с язвенным колитом составляло диагностическое облако заданного патологического состояния, которое по специальным статистическим критериям сравнивалось с аналогичным облаком больных синдромом раздраженного кишечника.

Результаты проведенных исследований по построению спектрометрических образов для больных язвенным колитом и синдромом раздраженного кишечника представлены на рисунке 1 и в таблице 1.

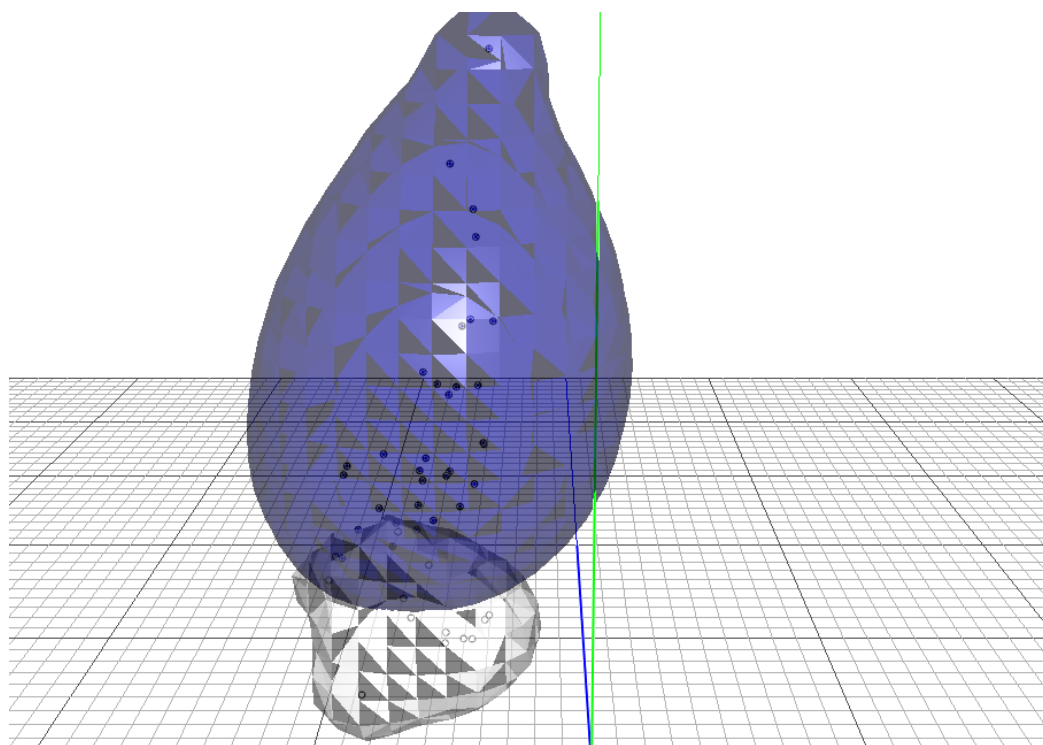


Рисунок 1 - Жидкостно-хроматографические спектрометрические образы ЯК (синий) и СРК (белый). Координаты: $X=A(1602)/A(1000)$, $Y=A(1545)/A(1926)$, $Z=A(835)/A(1315)$

Из приведенного рисунка видно, что облака спектрометрических образов для больных язвенным колитом практически полностью отделяются от облаков при синдроме раздраженного кишечника.

Таблица 1 - Статистический анализ дифференциальной диагностики ЯК и СРК

Характер процесса	СРК	ЯК
Количество больных	13	32
Истинная диагностика	11	28
Гиподиагностика (ложная диагностика)	2	4
Чувствительность (%)	84.6 (58.0 ÷ 98.9)	87.5 (73.4 ÷ 96.7)
Специфичность (%)	73.3 (46.5 ÷ 93.0)	93.3 (81.2 ÷ 99.4)
Диагностическая точность (%)	86.7 (76.6 ÷ 95.5)	
Хи-квадрат	27.2	
Доверительная вероятность (%)	99.7	

Таким образом, на данном примере доказана возможность применения технологии построения и оценки спектрометрических образов на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови для решения задачи

дифференциальной диагностики язвенного колита средней степени тяжести и синдрома раздраженного кишечника.

Для решения второй задачи были проведены исследования, в которых участвовали 41 больных с верифицированным диагнозом рака толстой кишки (основная группа). Группу сравнения составили 32 пациента с язвенным колитом средней тяжести в стадии обострения.

После выполнения исследования сыворотки крови у пациентов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, статистического анализа полученных хроматограмм и кластерного анализа выявлены диагностические показатели для пациентов с язвенным колитом и колоректальным раком, представленные на рисунке 2 и в таблице 2.

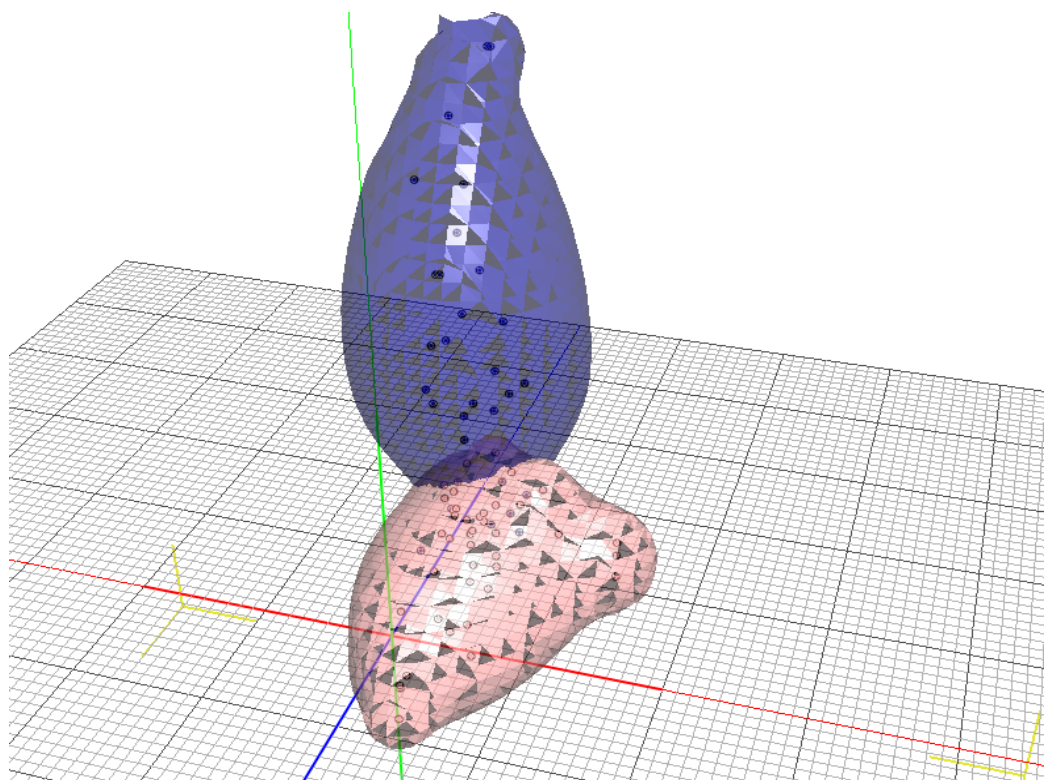


Рисунок 2 - Жидкостно-хроматографические спектрометрические образы ЯК (синий) и КРР (розовый). Координаты: $X=A(1602)/A(1265)$, $Y=A(1662)/A(926)$, $Z=A(780)/A(982)$

Таким образом, в результате выполненных исследований доказана возможность применения технологии построения и оценки спектрометрических образов на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови

для разграничения больных язвенным колитом средней тяжести и больных колоректальным раком.

Таблица 2 - Статистический анализ дифференциальной диагностики ЯК и КРР

Характер процесса	КРР	ЯК
Количество больных	41	32
Истинная диагностика	40	24
Гиподиагностика (ложная диагностика)	1	8
Чувствительность (%)	97.6 (90.7 ÷ 99.9)	75.0 (58.1 ÷ 88.7)
Специфичность (%)	83.3 (71.5 ÷ 92.4)	93.3 (79.6 ÷ 99.7)
Диагностическая точность (%)	87.7 (79.2 ÷ 94.2)	
Хи-квадрат	50.276	
Доверительная вероятность (%)	99.993	

Третья задача работы, состоящая в исследовании возможности высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови для скрининга потенциальной дисплазии слизистой оболочки толстой кишки у больных язвенным колитом, была решена путем отбора больных язвенным колитом по результатам гистологического исследования биоптатов слизистой оболочки толстой кишки. Жидкостно-хроматографический анализ и построение спектрометрических образов было проведено у 29 больных язвенным колитом, у которых установлен индекс гистологической активности 5-10 баллов. У 13 из них диагностирована дисплазия слизистой толстой кишки, а у 16 дисплазия не выявлена.

Совокупность спектрометрических образов для выборки пациентов с язвенным колитом без дисплазии слизистой оболочки составляло диагностическое облако патологического состояния, которое по статистическим критериям в дальнейшем сравнивалось с облаком больных язвенным колитом с наличием дисплазии слизистой оболочки, представлена на рисунке 3 и в таблице 3.

Из данного рисунка видно, что облака спектрометрических образов для больных язвенным колитом с наличием дисплазии слизистой оболочки практически полностью отделяются от спектрометрических образов больных, у которых дисплазии слизистой оболочки не выявлено. После выполнения статистических оценок полученных хроматограмм при помощи кластерного анализа установлены диагностические показатели и критерии диагностики для пациентов с язвенным колитом с наличием и без дисплазии слизистой оболочки толстой кишки.

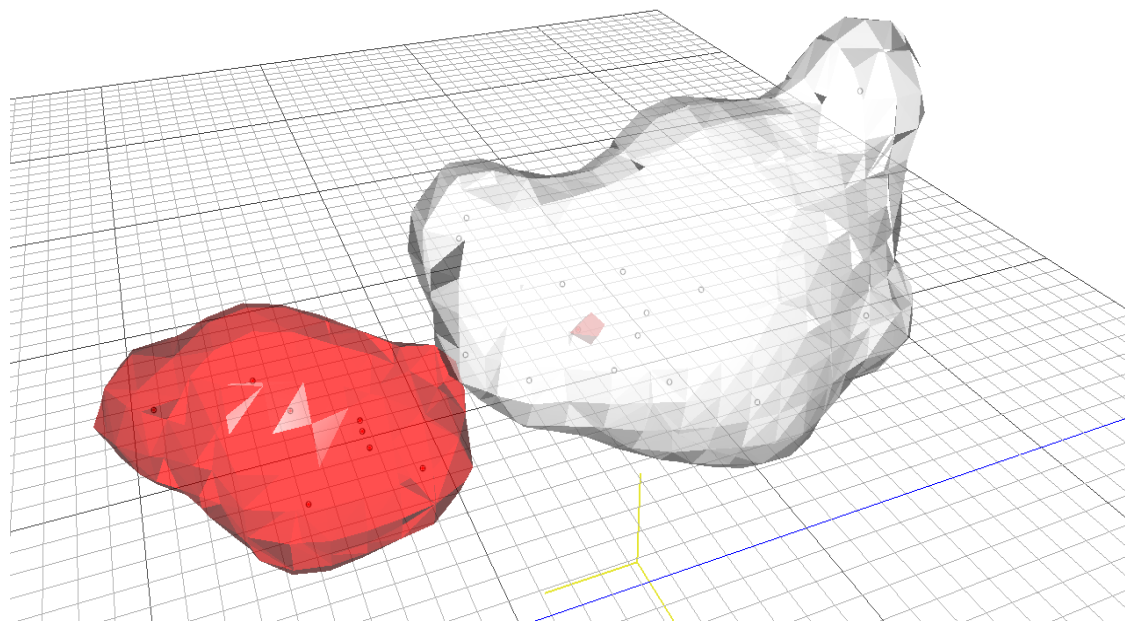


Рисунок 3 - Жидкостно-хроматографические спектрометрические образы ЯК без дисплазии (светлый) и ЯК с дисплазией слизистой оболочки толстой кишки (темный). Координаты: $X=A(1602)/A(1370)$, $Y=A(1662)/A(1315)$, $Z=A(2924)/A(926)$

Таблица 3 - Результаты статистического анализа для разграничения между группами больных язвенным колитом с дисплазией и без дисплазии слизистой оболочки толстой кишки при помощи ВЭЖХ сыворотки крови

Характер процесса	ЯК с дисплазией слизистой	ЯК без дисплазии слизистой
Количество больных	13	16
Истинная диагностика	10	14
Гиподиагностика (ложная диагностика)	3	2
Чувствительность (%)	82.8 (55.6 ÷ 98.4)	87.5 (65.5 ÷ 99.1)
Специфичность (%)	83.3 (54.7 ÷ 98.9)	82.4 (59.5 ÷ 96.9)
Диагностическая точность (%)	86.2 (70.8 ÷ 96.4)	
Хи-квадрат	20.0511	
Доверительная вероятность (%)	99.8	

Это явилось основанием для утверждения, что полученные дифференциально-диагностические спектрометрические образы пригодны для скрининга дисплазии при язвенном колите.

Таким образом, в результате выполненных исследований доказана возможность использования технологии построения и оценки спектрометрических образов на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки кро-

ви для скрининга дисплазии слизистой толстой кишки у больных язвенным колитом.

ВЫВОДЫ

1. Обоснованы порядок и правила применения технологии построения и анализа спектрометрических образов на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови для дифференциальной диагностики язвенного колита и синдрома раздраженного кишечника. Диагностическая точность составила 86.7%, чувствительность для группы больных синдромом раздраженного кишечника – 84.6%, для группы больных язвенным колитом – 87.5% при соответствующей специфичности 73.3% и 93.3%.

2. Оценены количественные закономерности построения и анализа спектрометрических образов на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови для проведения дифференциальной диагностики между язвенным колитом и раком толстой кишки. Диагностическая точность составила 87.7%, чувствительность для группы больных язвенным колитом – 75.0%, для группы больных колоректальным раком – 97.6% при соответствующей специфичности 93.3% и 83.3%.

3. Доказана возможность скрининга дисплазии слизистой оболочки толстой кишки у больных язвенным колитом с применением технологии построения и анализа спектрометрических образов на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови. Диагностическая точность составила 86.2%. Чувствительностью диагностики дисплазии у больных язвенным колитом достигла 82.8% и без дисплазии – 87.5% при соответствующей специфичности 83.3% и 82.4%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для дифференциальной диагностики синдрома раздраженного кишечника, язвенного колита, колоректального рака в практической деятельности гастроэнтерологов, терапевтов и врачей общей практики амбулаторного звена рекомендуется использовать высокоэффективную жидкостную хроматографию сыворотки

крови с компьютерным построением и анализом спектрометрических образов в комплексе с общепринятыми лабораторно-инструментальными обследованиями.

2. У больных с длительным анамнезом язвенного колита для скрининговой диагностики дисплазии слизистой оболочки толстой кишки во избежание трудоемкого и обременительного обследования больных (илеоколоноскопии с множественной биопсией) рекомендуется применять высокоэффективную жидкостную хроматографию сыворотки крови с построением и анализом спектрометрических образов болезней как на амбулаторном, так и госпитальном этапах обследования пациентов.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Перспективные направления данного исследования могут быть связаны с накоплением, сравнением и критическим анализом научно-практического материала о спектрометрических образах других болезней при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови. По мере накопления информации появиться возможность создания скрининговых подходов к распознаванию патологических нарушений в ранних фазах их проявлений.

Список работ, опубликованных автором по теме диссертации:

1. Возможности дифференциальной диагностики язвенного колита и болезни Крона с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови / О.П.Алексеева, Н.Н.Миронов, С.В.Криштопенко, Е.Н.Колодей // Медицинский альманах. – 2010. – № 1 (10). – С. 82–85.

2. Возможности использования высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови в дифференциальной диагностике воспалительных заболеваний кишечника (язвенный колит, болезнь Крона) и синдрома раздраженного кишечника / Е.Н.Колодей, Н.Н.Миронов, О.П.Алексеева, А.А.Игнатъев // Медицинский альманах. – 2011. – № 2 (15). – С. 36–39.

3. Возможности использования высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) сыворотки крови в дифференциальной диагностике воспалительных заболеваний кишечника и синдрома раздраженного кишечника /

Е.Н.Колодей, Н.Н.Миронов, О.П.Алексеева, А.А.Игнатъев // Российский журнал Гастроэнтерологии, Гепатологии, Колопроктологии. – 2011. – Т.21, № 5. – С. 171.

4. Дифференциальная диагностика воспалительных заболеваний кишечника (язвенный колит, болезнь Крона) и синдрома раздраженного кишечника с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови / Е.Н.Колодей, Н.Н.Миронов, О.П.Алексеева, А.А.Игнатъев // Материалы 13-го Международного Славяно-Балтийского научного форума «Санкт-Петербург – Гастро-2011». – Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2011. – № 2-3. – С. М40.

5. Алексеева О.П. Динамика клинического течения, диагностики и лечения воспалительных заболеваний кишечника в Нижегородской области в 2005-2010 годы / О.П.Алексеева, Е.Н.Колодей, Н.Н.Миронов // Медицинский Альманах. – 2013. – № 1 (25). – С.71–73.

6. Колодей Е.Н. Язвенный колит и рак толстой кишки: актуальные и нерешенные вопросы диагностики / Е.Н.Колодей // Медицинский Альманах. – 2013. – № 1 (25). – С.74–78.

7. Алексеева О.П. Динамика клинического течения, диагностики и лечения воспалительных заболеваний кишечника в Нижегородской области / О.П.Алексеева, Е.Н.Колодей // Медицинский алфавит. – 2016. – № 12 (275). – С. 27–31.

8. Alekseeva O.P. Technology of construction and analysis of liquid-chromatographic spectral images of blood serum for the diagnosis of dysplasia of the colon epithelium in patients with ulcerative colitis / O.P.Alekseeva, E.N.Kolodey // East European Science Journal. – 2016. – № 12. – P.18-23.

9. Алексеева О.П. Технология фиксации жидкостно-хроматографических спектральных образов сыворотки крови в диагностике дисплазии слизистой оболочки толстой кишки / О.П.Алексеева, Е.Н.Колодей // Казанский медицинский журнал. – 2017. – Т. 98, № 2. – С. 272-277. – DOI: 10.17750/КМЖ2017-272.

10. Алексеева О.П. Сравнительная оценка течения, диагностики и лечения воспалительных заболеваний кишечника в Нижегородской области 2014-2015 и 2009-2010 гг. / О.П.Алексеева, Е.Н.Колодей // Медицинский Альманах. – 2017. – № 1. – С. 33–36.

11. Колодей Е.Н. Диагностика дисплазии эпителия слизистой оболочки толстой кишки у больных язвенным колитом. Материалы 19-го Международного медицинского Славяно-Балтийского научного форума «Санкт-Петербург – Гастро-2017» / Е.Н.Колодей, О.П.Алексеева // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2017. – №1. – С.84.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЛТ – аланиновая трансаминаза

АСТ – аспарагиновая трансаминаза

ВЗК – воспалительные заболевания кишечника

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГГТ – гамма-глутамилтранспептидаза

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

КРР – колоректальный рак

СРК – синдром раздраженного кишечника

ПЭВМ – персональная электронно-вычислительная машина

ЩФ – щелочная фосфатаза

ЯК – язвенный колит

МАУО – показатель тяжести язвенного колита

\bar{X} – среднее значение показателя

P – вероятность ошибки (нулевой гипотезы)

Sx – среднее квадратическое отклонение