

УДК 616.33-074:543.544

ДИАГНОСТИКА И ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЙ ЖЕЛУДКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ СЫВОРОТКИ КРОВИ

С.В. Насонов, ООО «Медицинская диагностика», г. Н. Новгород,
О.П. Алексеева, д. м. н., профессор, Федеральный гастроэнтерологический центр ПФО при Нижегородской областной больнице им. Н.А. Семашко

Разработанный метод высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови пригоден для высокочувствительной и высокоспецифичной диагностики и высокоточной дифференциальной диагностики хронического гастрита и рака желудка, в том числе и на ранних стадиях. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови показан также для уточнения диагноза при наличии технических сложностей или невозможности проведения стандартного комплекса рентгенологического и эндоскопического обследования, особенно у пожилых людей и людей с выраженными анатомическими дефектами внутренних органов.

The designed method of high-yield liquid chromatography of blood serum is suitable for highly sensitive and high-avid diagnostics and for high-precision differential diagnostics of chronic gastritis and stomach cancer including early stages. The method of high-yield liquid chromatography of blood serum is evidenced also for more precise diagnostics under technical difficulties or impossibility of conducting of standard rontgenologic and endoscopic examination procedures especially with the elderly patients and patients with pronounced anatomic defects of internal.

Введение

Хронический гастрит является одним из наиболее часто встречающихся заболеваний, что ставит его в ряд важных медико-социальных проблем практического здравоохранения. Нарушение процессов пролиферации и дифференцировки железистого эпителия в слизистой оболочке [1, 8] при хроническом гастрите является начальным этапом формирования рака желудка [9], который стабильно остается на втором месте в структуре онкозаболеваемости у мужчин – 16,5% и на третьем у женщин – 13,3%. В структуре смертности у мужчин рак желудка занимает второе место – 19,0%, а у женщин первое – 19,3% [7]. Столь неутешительные исходы связаны с длительным бессимптомным течением заболевания. Общепринятая во всем мире схема диагностики рака желудка [6] оказалась неэффективной [7].

Перечисленные факторы определили необходимость поиска новых объективных способов ранней диагностики хронического гастрита и раннего рака желудка. Наиболее перспективным, с нашей точки зрения, является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Он удачно сочетает в себе высокую точность качественного и количественного анализа веществ, высокую автоматизацию, для исследования необходимы микроколичества искомого образца. Метод позволяет оптимальным образом получить информацию о биохимических процессах в организме [5].

Цель и задачи исследования

Цель исследования: изучить возможности метода высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки

крови для диагностики и дифференциальной диагностики хронического гастрита и рака желудка.

Для достижения указанной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. установить возможности высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови в диагностике и дифференциальной диагностике хронического гастрита и рака желудка;
2. найти комплексы информативных (характеристических) соотношений хроматографических пиков сыворотки крови, определяющие дифференциально-диагностические образы хронического гастрита и рака желудка на основе сопоставления с безусловно верифицированными окончательно установленными клиническими диагнозами в зависимости от пола и возраста;
3. разработать эффективные методы обработки данных хроматограмм сыворотки крови, обеспечивающие наибольшую точность при диагностике хронического гастрита и рака желудка.

Материалы и методы

Всего были обследованы 194 человека. Обследование больных проводилось на базе медицинских учреждений Нижнего Новгорода: поликлиники городского онкологического диспансера и больницы № 13. Были сформированы 3 группы: группа больных хроническим гастритом, группа больных раком желудка и контрольная группа. В каждой группе проводилось разделение на обучающую и экспертную выборки.

В контрольную группу вошли 43 практически здоровых добровольца, не имеющих патологии желудка, в возрасте от

23 до 54 лет. Группа больных хроническим гастритом состояла из 62 человек. Группа больных раком желудка состояла из 89 человек.

Во всех группах проводилось разделение по возрасту (до 55 лет и старше) и полу. Все больные с патологией желудка проходили клинико-лабораторное, рентгенологическое и эндоскопическое обследования. Критерием включения в исследование являлась обязательная гистологическая верификация диагноза. Из исследования исключались больные с сопутствующим хроническим заболеванием в стадии декомпенсации. Диагнозы формулировались в соответствии с международной (Сиднейской) классификацией гастритов [2], у больных раком желудка диагнозы формулировались в соответствии с критериями ВОЗ по системе TNM и по стадиям заболевания на основании классификации Минздрава СССР [9].

В качестве исследуемого субстрата была использована сыворотка крови. Забор крови проводился натошак из вены в количестве 5-10 мл. Полученная сыворотка (не менее 2 мл) высушивалась при 25°C до состояния сухой корочки и перемалывалась до состояния гомогенного порошка. Далее бралась навеска порошкообразной сыворотки в количестве 40 мг и проводилась экстракция 85% метанолом – 200 мкл в течение 45 минут. После центрифугирования смеси при ускорении 12G проводился отбор надосадочной жидкости. Полученный экстракт сыворотки подвергался хроматографическому исследованию [4]. При анализе использовалась стандартная методика исследования на хроматографе «Милюхром А-02» (ЗАО «Эконова», г. Новосибирск) [3].

Хроматограммы подвергались математической обработке с идентификацией наиболее значимых пиков и вычислением их площадей. Всем пикам было дано алфавитно-цифровое обозначение. Для анализа хроматограмм и оптимизации выделения наиболее значимых пиков использовался специальный программный пакет статистического анализа DiaStat [10], основанный на алгоритмах многомерного энтропийного анализа. Типичная хроматограмма сыворотки крови здорового человека представлена на рис 1.

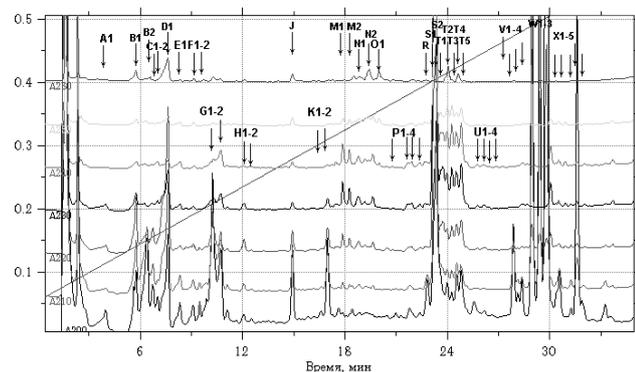


Рис. 1. Типичная хроматограмма сыворотки здорового человека.

Для каждого пика вычислялись соотношения его площади к площадям других пиков. Полученные отношения являлись параметрами, подлежащими статистической обработке.

УФ-детектирование велось в полосах: 200, 210, 220, 230, 240, 250 и 280 нм.

Результаты и обсуждение

После многовариантных расчетов ВЭЖХ-параметров и в результате сравнения их с безусловно верифицированными достоверными окончательными диагнозами соответствующих хроматограмм, были получены диагностические ВЭЖХ критерии в виде 3-мерных областей в ортогональной системе координат (X, Y, Z) для больных раком желудка, хроническим гастритом и контрольной группы. Для статистической оценки полученных распределений ВЭЖХ-параметров в образцах болезней использовались методы многомерного дискриминантного анализа статистической диалоговой системы STADIA 4,52 (копия 1102) (пример – таблица и рис. 2).

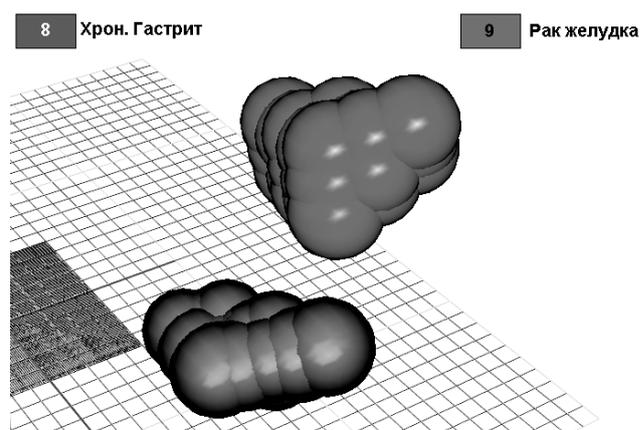


Рис. 2. ВЭЖХ-спектрометрические образы рака желудка (9 наблюдений) и хронического гастрита (8 наблюдений) в возрастной группе до 55 лет у женщин.

Координаты: $X=S(W 1200 \text{ нм})/S(R 1200 \text{ нм})$, $Y=S(W 2200 \text{ нм})/S(R 1200 \text{ нм})$, $Z=S(X 4200 \text{ нм})/S(W 4240 \text{ нм})$.

Таблица. Статистический анализ дифференциальной диагностики хронического гастрита и рака желудка в возрастной группе до 55 лет у женщин

Характер процесса	Рак	Гастрит
Количество больных	9	8
Истинная диагностика	9	8
Гиподиагностика	0	0
Чувствительность диагностики (%)	100	100
Диагностическая точность (%)	100	
Chi-квадрат	42,0570	
Доверительная вероятность (%)	99,76	

Величина критерия Хи-квадрат во всех случаях была больше табличной величины равной 11,345, для доверительной вероятности не менее 99%, что позволяет распространить полученный результат на генеральную совокупность с погрешностью не более 1% и, следовательно, использовать данные дифференциально-диагностические образы в качестве эталонных для диагностики.

На основании сформированного эталонного дифференциально-диагностического образа проводилась диагностика и дифференциальная диагностика в экспертных группах.



Итоговые результаты следующие: общая чувствительность диагностики рака желудка равняется 92%, при средней специфичности равной 93%. Общая чувствительность диагностики хронического гастрита равняется 96%, при средней специфичности равной 93%. Средняя диагностическая точность при дифференциальной диагностике хронического гастрита и рака желудка составила 94%.

Величина критерия Хи-квадрат во всех случаях больше табличной величины равной 7,81 для доверительной вероятности не менее 95% позволяет распространить полученный результат на генеральную совокупность с погрешностью не более 5%.

Выводы

1. Метод ВЭЖХ сыворотки крови пригоден для высокочувствительной и высокоспецифичной диагностики и высокоточной дифференциальной диагностики хронического гастрита и рака желудка, в т. ч. и на ранних стадиях.

2. Характер комплексов информативных соотношений пиков хроматограмм сыворотки крови у больных раком желудка и хроническим гастритом имеет значительные отличия в различные возрастные периоды жизни человека.

3. Разработанный пакет программ статистического анализа DiaStat обеспечил эффективный анализ хроматограмм, а выбранные методы статистического анализа оказались оптимальными.

Практические рекомендации

Разработанный способ диагностики и дифференциальной диагностики рака желудка и хронического гастрита методом ВЭЖХ сыворотки крови рекомендуется в качестве высокочувствительного и высокоспецифичного метода скрининговой диагностики в поликлиниках гастроэнтерологических и онкологических диспансеров. Разработанный способ дифференциальной диагностики рака желудка и хронического гастрита методом ВЭЖХ сыворотки крови рекомендуется также в качестве дополнительного метода обследования на базе поликли-

ник и стационаров гастроэнтерологического и онкологического профилей в комплексе со стандартным клинико-лабораторным, рентгенологическим и инструментальным обследованиями.

Метод ВЭЖХ сыворотки крови показан для уточнения диагноза при наличии технических сложностей или невозможности проведения стандартного комплекса рентгенологического и эндоскопического обследований, особенно у пожилых людей и людей с выраженными анатомическими дефектами внутренних органов.



ЛИТЕРАТУРА

1. Аруин Л.И., Капуллер Л.Л., Исаков В.А. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника. – М.: Триада-Х, 1998. – 496 с.
2. Аруин Л.И. Новая международная морфологическая классификация хронического гастрита (модификация Сиднейской системы) // Архив патологии. – 1997. – № 3. – С. 3-6.
3. Барам Г.И. Высокоэффективная микроколоночная обращенно-фазовая хроматография пептидов. // Тез. докл. IV Всесоюз. симпоз. по молек. жидк. хроматографии в Алма-Ате. – Черноголовка. – 1987. – С. 263-265.
4. Батова Е.А., Зозин Е.В., Игнатъев А.А., Назаров Д.П., Насонов С.В. Способы и техника пробоподготовки сложных биожидкостей для скрининговых исследований методом ВЭЖХ // Тез. докл. XII Нижегородской сессии молодых ученых. – Н. Новгород. – 2007. – С. 8-9.
5. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии: Пер. с англ. / Под ред. А. Хеншен и др. – М.: Мир, 1988. – 688 с., ил.
6. Григорьев П.Я. Методические рекомендации по диагностике и лечению больных с заболеваниями органов пищеварения // Практикующий врач. – 2002. – № 1. – С. 1-27.
7. Под ред. В.И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. Состояние онкологической помощи населению России в 2005 году. – М.: ФГУ МНИОИ им. А.П. Герцена Росздрава, 2006. – 186 с.: ил.
8. Рысс Е.С. Современные представления о хроническом гастрите (определение, механизмы развития, классификация, клиническая картина, лечение) // Тер. архив. – 1999. – № 2. – С. 7-13.
9. Рысс С.М. Болезни органов пищеварения. – Л.: Медицина, 1966. – 591 с.
10. Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ № 2007611453. Программа для обработки спектров и создания экспертных диагностических систем DiaStat / Насонов С.В., Игнатъев А.А., Казаковцев А.В., Чельшев И.В.