

4. Ольбинская, Л.И. Эндотелиальная дисфункция у больных ишемической болезнью сердца, осложненной хронической сердечной недостаточностью, и возможности коррекции изосорбид-5-моноклатом / Л.И. Ольбинская, Ж.М. Сизова, А.В. Ушакова // Кардиология. – 2001. – №3. – С. 29-32.
5. Peripheral vascular remodelling as a mechanism of exercise limitation in patients with chronic heart failure / Yu. et al. // Eur. Heart. J. – 1998. – №19. – Е. 65.
6. Визир, В.А. Перспективы реверсии эндотелиальной дисфункции у больных с застойной сердечной недостаточностью / В.А. Визир, А.Е. Березин // Клин. мед. – 2000. – №7. – С. 36-39.
7. Балуда, В.П. Значение определения антитромбогенных свойств стенки сосудов в профилактике тромбозов / В.П. Балуда, И.И. Деянов // Кардиология. – 1988. – №5. – С. 103-104.
8. Lieberman, E.H. Flow-induced vasodilation of the human brachial artery is impaired in patients / E.H. Lieberman, M.D. Gerhard, A. Uehata et al. // Am. J. Cardiol. – 1996. – №78. – Е. 22-27.
9. Затеишикова, А.А. Эндотелиальная регуляция сосудистого тонуса: методы исследования и клиническое значение / А.А. Затеишикова, Д.А. Затеишиков // Кардиология. – 1998. – №9. – С. 69-80.
10. Cioffi, G. Systemic thromboembolism in chronic heart failure. A prospective study in 406 patients / G. Cioffi // Eur. Heart. J. – 1996. – №17. – Е. 1381-1389.
11. Vanhoutte, P.M. Endothelial dysfunction and atherosclerosis / Vanhoutte P.M. // Eur. Heart. J. – 1997. – №18. – Е. 19 – 29.

УДК 616.34 – 07(045)

## ВОЗМОЖНОСТИ ДИАГНОСТИКИ БОЛЕЗНИ КРОНА В СТАДИИ ОБОСТРЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ СЫВОРОТКИ КРОВИ

**Н.Н. Миронов** - ГУЗ Нижегородская областная клиническая больница им. Н.А.Семашко, заместитель главного врача; **С.В. Насонов** - начальник вычислительного центра ООО «Медицинская диагностика», г. Нижний Новгород; **О.П. Алексеева** - директор гастроэнтерологического центра Приволжского федерального округа РФ, г. Нижний Новгород, доктор медицинских наук, профессор; **С.В. Криштопенко** - заместитель директора гастроэнтерологического центра Приволжского федерального округа РФ, г. Нижний Новгород, доктор медицинских наук, профессор. E-mail: al\_op@mail.ru

Обследованы 15 больных с эндоскопически и морфологически верифицированным диагнозом болезни Крона и 14 здоровых лиц в возрасте от 23 до 54 лет. Индекс активности болезни Крона составил от 235 до 310 ед. Изучена возможность использования высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови для диагностики болезни. Высушенный экстракт сыворотки крови подвергался исследованию на хроматографе «Милихром А-02» (ЗАО «Эконова», Новосибирск). Обработка хроматограмм производилась при помощи многоуровневого кластерного анализа с формированием трехмерного образа патологического состояния, достоверно отличающегося от образа здорового человека. Диагностическая чувствительность и точность метода достигали 100%.

**Ключевые слова:** болезнь Крона, диагностика, жидкостная хроматография.

## CROHN'S DISEASE DIAGNOSTICS IN ACUTE STAGE WITH THE USE OF HIGHLY EFFECTIVE LIQUID CHROMATOGRAPHY BLOOD SERUM

**N.N. Mironov** - Nizhni Novgorod Regional Clinical Hospital named after N.A.Semashko, Assistant of Head Physician; **S.V. Nasonov** - Head of Computer Centre «Medical Diagnostics» Ltd, Nizhni Novgorod; **O.P. Alekseeva** - Director of Gastroenterological Centre of Volga Region Federal District of the Russian Federation, Nizhni Novgorod, Doctor of Medical Science, Professor; **S.V. Krishtopenko** - Deputy Director of Gastroenterological Centre of Volga Region Federal District of the Russian Federation, Nizhni Novgorod, Doctor of Medical Science, Professor, e-mail: al\_op@mail.ru

15 patients with the endoscopically and morphologically verified diagnosis of the Crohn's disease and 14 healthy humans at the age of 23 – 24 years have been examined. The Crohn's disease index activity was 235 – 310 units. The possibility highly effective liquid chromatography blood serum use for diagnosis of the disease has been studied. A blood serum dried extract has been investigated on the "Milichrome A 02" chromatograph (Novosibirsk, "Econova" joint-stock company). The chromatograms have been treated with the use of a multilevel cluster analysis with a pathologic three-measured state form, differing from a healthy human. A diagnostic sensitivity and accuracy of the method has achieved 100%.

**Key words:** the Crohn's disease, diagnostics, liquid chromatography

### Актуальность.

Болезнь Крона – это хроническое заболевание пищеварительного тракта с сегментарным трансмуральным гранулематозным воспалением.

Распространенность болезни Крона в разных странах колеблется от 20 до 150 случаев на 100 000 населения. Ежегодное появление новых случаев болезни среди населения США и Западной Европы составляет 2–8 на 100 000 жителей. В Московской области в 1997 г. они составляли: распространенность – 3,5 на 100 000 населения, заболеваемость – 0,3 на 100 000 населения [1,2,13,14].

Несмотря на то, что этиология болезни Крона до сих пор остается неясной, патогенез болезни изучен достаточно основательно, и принято считать, что раз-

витие болезни Крона зависит от взаимодействия трех иницируемых факторов: восприимчивости организма, состояния кишечной микрофлоры и состояния местного иммунитета.

Диагностика болезни Крона основывается на данных клинического обследования больных, результатах лабораторных и инструментальных методов. Основными инструментальными методами являются рентгенологический (ирригоскопия и изучение пассажа бария по тонкой кишке), эндоскопический (колоноскопия и эзофагогастродуоденоскопия) и гистологическое исследование. Для установления клинического диагноза достаточно положительного результата одного из трех указанных методов. Использо-

ние капсульной эндоскопии еще нельзя отнести к надежному методу диагностики болезни Крона [8].

До настоящего времени болезнь Крона все еще остается трудно диагностируемым заболеванием. Трудности диагностики связаны с возможной локализацией процесса в любом отделе желудочно-кишечного тракта, системными проявлениями болезни и неспецифическими клиническими симптомами. Это вызывает необходимость дальнейшей разработки новых способов диагностики данного заболевания. В 40 – 50% случаев болезнь Крона диагностируется во время оперативного вмешательства по поводу рецидивирующих болей в животе или частичной кишечной непроходимости.

В качестве одного из возможных направлений в лабораторной диагностике болезни Крона нами были изучены особенности показателей высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) сыворотки крови у больных в фазе обострения.

ВЭЖХ является современным высокоточным аналитическим методом, позволяющим проводить разделение и анализ компонентов в сложных биологических смесях. Она уже с успехом применяется для диагностики некоторых заболеваний [9, 11].

В качестве объекта исследования нами была выбрана сыворотка крови, как наиболее доступный материал, несущий в себе максимально возможную информационную нагрузку о состоянии систем и органов человека [3].

**Цель исследования.** Изучить возможность использования высокоэффективной жидкостной хроматографии для диагностики болезни Крона, определить чувствительность и диагностическую точность метода.

#### **Материалы и методы исследования.**

В проведенном исследовании участвовали 29 пациентов. Все пациенты были разделены на 2 группы. В контрольную группу вошли 14 практически здоровых людей-добровольцев в возрасте от 23 до 54 лет.

Исследуемую группу составили 15 больных (11 мужчин и 4 женщины в возрасте от 21 до 56 лет) с болезнью Крона с верифицированным диагнозом в стадии обострения, который оценивался по стандартному международному индексу (CDAI) активности болезни Крона [12]. Величина данного индекса составляла у больных от 235 до 310 единиц (среднее значение 268.1), что соответствует средней степени активности болезни. Диагноз болезни Крона у всех пациентов был подтвержден при помощи рентгенологического и/или эндоскопического и морфологического методов.

В исследование не включали больных с сопутствующей патологией в стадии декомпенсации или обострения. Сопутствующие заболевания у включенных в исследование больных были: хронический гастрит – у 5 лиц, хронический холецистит – у 3 больных, хронический панкреатит – у 1 больного, артериальная контролируемая гипертензия – у 3 лиц.

Забор крови проводили у пациентов натощак из вены в количестве 5 – 10 мл. Полученную сыворотку (не менее 2 мл) высушивали при 25°C до состояния сухой корочки и перемалывали до состояния гомогенного порошка. Далее брали навеску порошкообразной сыворотки в количестве 40 мг и проводили экстракцию 85%-ным метанолом – 200 мкл в течение 45 минут. После осаждения крупно- и среднемолекулярных белков проводили центрифугирование

смеси при ускорении 12000 об/мин с последующим отбором надосадочной жидкости. Полученный таким образом экстракт сыворотки крови подвергали хроматографическому исследованию.

При анализе использовали стандартную методику исследования на хроматографе «Милихром А-02» (ЗАО «Эконова», Новосибирск). Современные жидкостные хроматографы на микроколонках типа «Милихром А-02» представляют собой аналитический комплекс функционально объединенных устройств, обеспечивающих разделение жидких смесей, детектирование, идентификацию и количественный учет компонентов смеси. Контрольная программа встроенного в спектрофотометр компьютера не допускает неправильных и несовместимых параметров, обеспечивая автоматический набор пробы, спектрофотометрическое детектирование, объективность и высокую точность анализов. Статистическая обработка массива хроматограмм выполнялась на основе многоуровневого кластерного анализа с формированием трехмерного образа нормы или патологического состояния при помощи специальной компьютерной программы [10].

#### **Результаты и обсуждение**

В исследование были включены больные только со средней степенью активности болезни Крона с CDAI от 235 до 310 единиц с целью формирования однородной группы для последующего спектрометрического анализа.

Основным клиническим проявлением обострения болезни Крона у всех пациентов была боль в животе незначительная или умеренно выраженная в околопупочной или правой подвздошной области, не требующая приема анальгетических препаратов. Кроме того, у большинства больных (11 из 15) отмечали учащение стула до 4 – 6 и более раз в сутки без примеси крови. Субфебрильная температура присутствовала у 8 больных. Кожные изменения в виде узловатой эритемы проявились у 2 лиц, васкулита – у 2 лиц. Артралгия зафиксирована у 4 больных.

По результатам рентгенологического исследования кишечника и/или фиброколоноскопии, лапароскопии (у 2 больных) локализация процесса только в тонкой кишке (терминальный илеит) была у 6 больных, в тонкой и толстой кишке (илеит, сигмоидит, проктит) – у 6 больных, только в толстой кишке (сигмоидит) – у 2 больных, и только в прямой кишке – у 1 больного. У 3 больных в анамнезе была резекция участка кишечника по поводу болезни Крона 1-2 года назад.

После выполнения анализа сыворотки крови у пациентов методом ВЭЖХ и статистического анализа результатов полученных газохроматограмм при помощи кластерного анализа установлены диагностические показатели и критерии диагностики для пациентов с болезнью Крона, приведенные в табл. 1.

Результаты, приведенные в таблице 1, показывают практически полное разграничение показателей ВЭЖГ у здоровых людей и пациентов с болезнью Крона, что демонстрируется на рисунке 1.

Проводя обсуждение результатов исследования, необходимо подчеркнуть, что сыворотка крови, несмотря на то что является очень сложной по своему составу, подчинена единым физико-химическим принципам строения и функционирования биологических жидкостей. При дегидратации молекулы и молекулярные комплексы претерпевают пространственные перемещения

и локализируются в строго определенном месте в форме фиксированной волны по ВЭЖХ. При этом каждая волна соответствует градиенту концентрации определенной группы ассоциированных молекул, близких по своей физико-химической структуре. В сыворотке крови подавляющее большинство молекул находится в виде надмолекулярных комплексов. Организационная ауто-волновая структура дегидрированной сыворотки отражает спектр этих комплексов на хроматограмме. Фазовый переход биологической жидкости из неупорядоченного жидкого состояния в твердое путем высушивания организует определенный стохастический порядок, который становится наблюдаемым даже на макроскопическом уровне [4]. Волновые ритмы различного характера и качества являются одной из форм самоорганизации живой материи и ее взаимосвязи как с внутренней, так и с внешней средой [5, 6].

При любом заболевании наблюдаются изменения в биосинтезе белков, нуклеиновых кислот, полипептидов и других соединений, которые поступают в кровь, и могут быть обнаружены [7]. Почти все зарегистрированные на хроматограмме пики являются олигопептидами, пептидами или низкомолекулярными белками. На этом основании существует вполне реальная возможность использования метода ВЭЖХ для лабораторной диагностики многих заболеваний, и в частности, болезни Крона.

Таким образом, в результате выполненных исследований показана возможность использования метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для диагностики болезни Крона. Диалектически сам метод высокоэффективной жидкостной хроматографии уникально сочетает элементы анализа, определяемые хроматографическим разложением такого биологического субстрата организма, как сыворотка крови на микроструктуры, и элементы синтеза, осуществляемые посредством многоуровневого кластерного анализа с формированием стабильного положения конечного образа в трехмерном пространстве.

**Выводы**

1. Технология построения и анализа жидкостно-хроматографических спектральных образов сыворотки крови может быть использована для диагностики болезни Крона в активной фазе. Диагностическая чувствительность и точность составили 100%.
2. Установлены новые закономерности в изменении спектральных свойств сыворотки крови при болезни Крона по сравнению со здоровыми пациентами. Создана динамичная база данных жидкостно-хроматографических образов сыворотки крови у пациентов с болезнью Крона, которая может быть использована в клинической практике для решения задач диагностики и дифференциальной диагностики.

Таблица 1

**Результаты статистического анализа диагностики между группой пациентов с болезнью Крона и здоровыми людьми при помощи ВЭЖХ**

Показатели	Контроль	Болезнь Крона
Количество пациентов	14	15
Истинная диагностика	14	15
Гиподиагностика	0	0
Чувствительность диагностики (%)	100	100
Диагностическая точность (%)	100	
Критерий хи-квадрат	34,5166	
Уровень вероятности (%)	99,78	

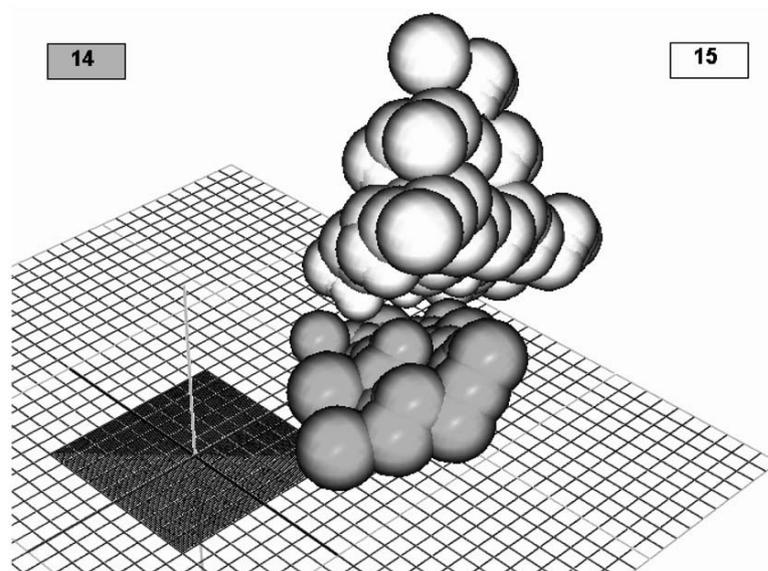


Рис. 1. ВЭЖХ-спектрометрические образы здоровых людей (темная окраска) и пациентов с болезнью Крона (светлая окраска).

**БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.**

1. Белоусова, Е.А. Эпидемиология воспалительных заболеваний кишечника в России / Е.А. Белоусова. – Материалы Фальк симпозиума. – № 154. – 2006. – С. 38-39.
2. Белоусова, Е.А. Язвенный колит и болезнь Крона / Е.А. Белоусова. – Тверь: Триада, 2002.
3. Шатохина, С.Н. Диагностическое значение профильной дегидратации сыворотки крови: структурная форма информации / С.Н. Шатохина, В.Н. Шабалин // Журнал для врачей «Лаборатория». – 1999. – № 4.
4. Шабалин, В.Н. Аутогенные ритмы и самоорганизация биожидкостей // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины / В.Н. Шабалин, С.Н. Шатохина. – 1996. – №10. – С. 364-371.
5. Гласе, Л. // От часов к хаосу. Ритмы жизни / Л. Гласе, М. Мэки. – М.: Мир, 1991. – 240 с.
6. Гленсдорф, Т.Т. Термодинамическая теория структуры, устойчивости и флуктуаций / Т.Т. Гленсдорф, И. Пригожин. – М.: Мир, 1973.
7. Горизонтов, П.Д. Гомеостаз / П.Д. Горизонтов. – М.: Медицина, 1981. – 575 с.
8. Старков, Ю.Г. Возможности капсульной эндоскопии: информативность, неудачи, недостатки / Ю.Г. Старков, Л.В. Домарев // Эндоскопическая хирургия. – 2004. – № 5. – С. 8-12.
9. Насонов, С.Н. Особенность высокоэффективной жидкостной хроматографии анализа гликлазида в плазме крови / С.Н. Насонов, А.Ю. Диш, В.А. Хазанов // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической фармакологии. – Томск: Изд-во Том. ун-та, – 2001. – С. 61-63.
10. Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ № 2007 61 453. Программа для обработки спектров и создания экспертных диагностических систем DataStat / С.В. Насонов и соавт., 2007.
11. Гурто, Р.В. Взаимосвязь фармакокинетики лоратадина и гликлазида с состоянием системы энергопродукции: Автореф. дис. ... канд. мед. наук / Р.В. Гурто. – Томск, 2005. – 22 с.
12. Development of Crohn's di-sease activity index. National Cooperative Crohn's disease Study / W.R. Best, J.M. Beckett, J. W. Singleton et al. // Gastroenterology. – 1976. – V. 70. – P. 439-444.
13. Loftus, E.V.Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence prevalence, and environmental influences / E.V.Jr. Loftus // Gastroenterol. – 2004. – V. 126, № 6. – P. 1504-1517.
14. Marshall, J.K. Environment and Epidemiology of inflammatory bowel disease. In: Satsangi J, Sutherland LR, editors / J.K. Marshall, R.J. Hilsden // Inflammatory Bowel Disease. Elsevier Ltd, 2003.



*на заметку*

**Сотрудниками Саратовского государственного медицинского университета получены патенты:**

1. № 2318552 Способ снижения повышенной функциональной активности тромбоцитов в условиях *in vitro* / В.Ф. Киричук, Е.В. Андронов, В.Д. Тупикин, А.П. Креницкий, А.В. Майбородин.
2. № 2323751 Способ лечения диабетической периферической полинейропатии / Н.А. Болотова, С.В. Худошина, Н.Ю. Райгородская.
3. № 2324453 Аппарат для коррекции сужения зубной дуги верхней челюсти / Л.А. Гооге, В.Н.Николенко, Ю.Ю. Розалиева.
4. № 2325146 Способ реабилитации больных рассеянным склерозом с нарушениями двигательной функции / А.Н. Субботин, А.В. Сумбаев, О.П. Семенова, П.В. Решетов, Д.А. Кедоров, О.Н. Воскресенская.