

УДК (616.348-002.44+616.344-002-031.84)-079.4:616.15-07

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,
ГВЗ «Нижегородская областная клиническая больница им. Н.А. Семашко»

Алексеева Ольга Поликарповна – e-mail: al_op@mail.ru

Обследован 61 пациент (46 – язвенный колит (ЯК), 15 – болезнь Крона (БК)) в активной фазе заболевания с эндоскопически и морфологически верифицированным диагнозом. Изучена возможность использования высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови для дифференциальной диагностики заболеваний (ЯК и БК). Высушенный экстракт сыворотки крови подвергался исследованию на хроматографе «Милихром А-02». Обработка хроматограмм производилась при помощи многоуровневого кластерного анализа с формированием трехмерных образов патологических состояний, достоверно отличающегося при ЯК и БК. Диагностическая чувствительность и точность метода достигала 100%.

Ключевые слова: язвенный колит, болезнь Крона, дифференциальная диагностика, жидкостная хроматография.

61 patients (46 – Ulcerative colitis, 15 – Crohn's disease in active phase) with the endoscopically and morphologically verified diagnosis are examined. A possibility of a blood serum highly effective fluid chromatography use for the disease diagnosis is studied. A blood serum dried extract was investigated on the «Milichrome A 02» chromatograph. The chromatograms were study with a use of a multilevel cluster analysis with a pathologic state three-measured form, trustworthy differing from Ulcerative colitis and Crohn's disease. A diagnostic sensitivity and accuracy of the method was achieving 100%.

Key word: Ulcerative colitis, Crohn's disease, differential diagnostic, fluid chromatography.

Введение

Воспалительные заболевания кишечника, прежде всего язвенный колит (ЯК) и болезнь Крона (БК), по частоте осложнений, тяжести течения, инвалидизации лиц молодого возраста занимают одно из ведущих мест в структуре болезней желудочно-кишечного тракта. При этом во всем мире, в том числе и в России, отмечается четкая тенденция увеличения распространенности этой патологии среди всех возрастных групп. Диагностика этих заболеваний продолжает представлять трудности для клиницистов. «Диагностические ловушки» ставят в тупик даже опытных клиницистов, а у 10–15% больных не удается разграничить эти два заболевания [1, 2].

Существенные трудности в диагностике воспалительных заболеваний кишечника связаны с поздним обращением пациентов за медицинской помощью, плохой осведомленность врачей первичного звена об этих заболеваниях, многообразной клинической картиной и системными проявлениями болезни, необходимостью использования для диагностики рентгенологических (ирригоскопия и изучение пассажа бария по тонкой кишке, эндоскопических (фиброколоноскопия, фиброгастродуоденоскопия) и морфологических методов. Средние сроки постановки диагноза ЯК от начала заболевания составляют от 2 до 8 месяцев, болезни Крона – от 6 месяцев до 2 лет. Все это создает необходимость поиска новых диагностических методов ЯК, БК и способов их разграничения.

В современной аналитической химии и биохимии широко применяется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) биохимических сред [3, 4].

Цель исследования: апробация возможности применения высокоэффективной жидкостной хроматографии сыворотки крови для дифференциальной диагностики ЯК и БК.

Материалы и методы

Обследован 61 пациент (46 – с ЯК, 15 – с БК). Мужчин – 35 человек (из них 28 – с ЯК, 7 – с БК), женщин – 26 человек (из них 18 – с ЯК, 8 – с БК). Средний возраст больных составил 35,3 года (у мужчин – 34 года, у женщин – 36 лет).

Больные ЯК имели давность заболевания от 6 месяцев до 25 лет, большинство больных (55%) имели давность заболевания от 1 года до 5 лет. Больные БК имели давность заболевания от 6 месяцев до 10 лет. В исследование не включались больные с тяжелой сопутствующей патологией. Диагноз у всех больных верифицирован эндоскопически и морфологически. Тяжесть ЯК оценивалась по международному критерию PGA. Значение данного показателя составило у больных от 5 до 11 баллов.

Тяжесть БК оценивалась по стандартному международному индексу активности болезни Крона (CDAI). Величина данного индекса составляла у больных от 220 до 450 ед.

В качестве объекта исследования была выбрана сыворотка крови как наиболее доступный материал, несущий в себе максимально возможную информацию о состоянии органов человека.

Забор крови в количестве 5–10 мл проводился у пациентов натощак. 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 в течение 45 минут. После осаждения крупно- и среднемолекулярных белков проводилось центрифугирование смеси при скорости 12 000 об./мин., с последующим отбором надосадочной жидкости. Полученный таким образом экстракт сыворотки крови подвергался хроматографическому исследованию.

При анализе использовалась стандартная методика исследования на хроматографе «Миличром А-02» (ЗАО «Эконова», г. Новосибирск). Современные жидкостные хроматографы на микроволнах типа «Миличром 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. С использованием специальной диагностической системы STADIA 4,52 на основе многоуровневого кластерного анализа формировались трехмерные образы заболевания [5].

Результаты и обсуждение

Результатами исследования являлись построенные при помощи ВЭЖХ спектральные образы сыворотки крови, которые статистически достоверно разграничивали группы больных ЯК и БК.

ВЭЖХ спектральные образы сыворотки крови больных ЯК и БК, представленные на рисунке, имеют свои специфические характеристики и не пересекаются.

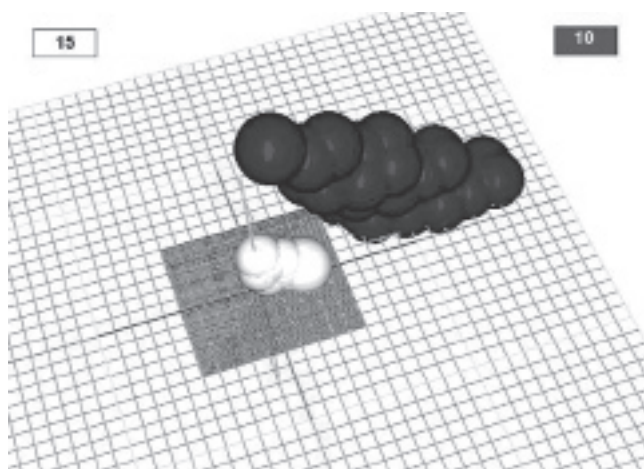


РИС.

Жидкостно-хроматографические спектральные образы сыворотки крови групп больных язвенным колитом (синяя окраска) и болезнью Крона (белая окраска).

На рисунке видно практически полное расхождение диагностических образов язвенного колита и болезни Крона.

Результаты статистического анализа, представленные в таблице, показывают полное разграничение показателей ВЭЖГ у больных язвенным колитом и болезнью Крона с чувствительностью 100% и уровнем вероятности по критерию хи-квадрат 99.81.

ТАБЛИЦА.

Результаты статистического анализа для дифференциальной диагностики между группами больных язвенным колитом и болезнью Крона при помощи ВЭЖХ сыворотки крови

Показатели	Болезнь Крона	Язвенный колит
Количество больных	15	46
Истинная диагностика	15	46
Гиподиагностика	0	0
Чувствительность диагностики (%)	100	100
Диагностическая точность (%)	100	
Критерий хи-квадрат	39,984	
Уровень вероятности (%)	99,81	

В результате выполненных исследований показана возможность использования технологии построения и анализа жидкостно-хроматографических спектральных образов сыворотки крови для дифференциальной диагностики язвенного колита болезни Крона в стадии обострения. Чувствительность и точность диагностики составили 100%.

Проводя обсуждение результатов исследования необходимо подчеркнуть, что патогенетические механизмы ЯК и БК не идентичны. Существуют особенности иммунных сдвигов, изменения в функции макрофагов, выделении специфических медиаторов воспаления, выработки аутоантител и другие специфические отличия [6].

Применение иммуногистохимических методов исследования позволило обнаружить увеличение количества иммуноглобулин-G-содержащих клеток в слизистой оболочке толстого кишечника. При этом продукция Gg-G-1 субкласса увеличивается в ответ на пептидные антигены, а продукция Gg-G-2-субкласса – в ответ на действие бактериальных антигенов. Первый вариант был характерен для ЯК, второй – для БК [7].

Указанные особенности патогенеза ЯК и БК создают предпосылку для разграничения этих заболеваний, в частности, использование метода ВЭЖХ. Сыворотка крови, несмотря на то, что является очень сложной по своему составу субстанцией, подчинена единым физико-химическим принципам строения и функционирования биологических жидкостей. При дегидратации молекулы и молекулярные комплексы претер-

певают пространственные перемещения и локализируются в строго определенном месте в форме фиксированной волны на хроматографе. При этом каждая волна соответствует градиенту концентрации групп ассоциированных молекул, близких по своей физико-химической структуре. Волновые ритмы различного характера и качества являются одной из форм самоорганизации живой материи и ее взаимосвязи как с внешней, так и с внутренней средой организма [8, 9].

Почти все зарегистрированные на хроматограмме пики являются олигопептидами, пептидами или низкомолекулярными белками. На этом основании существует реальная возможность построения специфических образов болезней, в том числе ЯК и БК, которые будут отличаться по своим временным и частотным характеристикам. Диалектически сам метод ВЭЖХ уникально сочетает элементы анализа, определяемые хроматографическим разложением такого биологического субстрата, как сыворотка крови на микроструктуры, и элементы синтеза, осуществляемые посредством многоуровневого кластерного анализа с формированием стабильного положения конечного образа в трехмерном пространстве, которое и осуществляется с использованием специальной компьютерной программы [5].

Выводы

1. Метод ВЭЖХ сыворотки крови позволяет проводить диагностику и дифференциальную диагностику язвенного колита и болезни Крона на основе построения трехмерных образов болезней.
2. Диагностическая чувствительность и точность метода составила 100%.

МА

ЛИТЕРАТУРА

1. Белоусова Е.А. Рекомендации по диагностике и лечению болезни Крона. // Фарматека. 2009. № 13 (187). С. 38–44.
2. Loftus E.V.J. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Oncidence prevalence and environmental influences. // Gastroenterol. 2004. V. 126. № 6. P. 1504–1517.
3. Насонов С.Н., Диш А.Ю., Хазанов В.А. Особенность высокоэффективной жидкостной хроматографии анализа гликозида в плазме крови. // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической фармакологии. Томск: Издательство Томского университета, 2001. С. 61–63.
4. Барам Г.И. Хроматограф Милихром А-02. Определение веществ с применением баз данных ВЭЖХ–УФ. Новосибирск. 2005. 64 с.
5. Насонов С.В. Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 200761453. Программа для обработки спектров и создания экспертных диагностических систем Data Stat. 2007.
6. Белоусова Е.А. Язвенный колит и болезнь Крона. Тверь: Триада, 2002. 127 с.
7. Dalton H.R. Yewell D.P. The immunology of inflammatory bowel disease. Inflammatory Bowel Disease. Ed. by G. Jarnerot. 1992. P. 125–147.
8. Глестдорф Т.Т., Пригожин Н.В. Термодинамическая теория структуры, устойчивости и флуктуации. М.: Мир, 1973. 243 с.
9. Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. Аутогенные ритмы и самоорганизация биожидкостей. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1996. № 10. С. 364–371.