

На правах рукописи

ЛУЦЕВА ОКСАНА АЛЕКСЕЕВНА

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО
АНАЛИЗА ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНО-
СТИКИ ОСТРОГО АППЕНДИЦИТА И ПОЧЕЧНОЙ
КОЛИКИ**

14.01.17 – хирургия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Астрахань – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

ЗУРНАДЖЬЯНЦ Виктор Ардоваздович, доктор медицинских наук, профессор, Заслуженный деятель науки РФ, Заслуженный врач РФ

Научный консультант:

КЧИБЕКОВ Элдар Абдурагимович, доктор медицинских наук, доцент

Официальные оппоненты:

ГРОШИЛИН Виталий Сергеевич, доктор медицинских наук, профессор, кафедра хирургических болезней №2 ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, заведующий кафедрой.

КЛИМОВИЧ Игорь Николаевич, доктор медицинских наук, доцент, кафедра госпитальной хирургии ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, профессор кафедры.

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Екатеринбург.

Защита состоится «___» ноября 2019 года в ___ часов на заседании совета Д 208.005.02 по защите диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, на соискание учёной степени доктора наук при ФГБОУ ВО «Астраханский ГМУ» Минздрава России (414000, Россия, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте <http://astgmu.ru> Астраханского ГМУ Минздрава России

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Учёный секретарь диссертационного совета

к.м.н.

Севостьянова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Острый аппендицит (ОА) по частоте занимает первое место среди острых хирургических заболеваний органов брюшной полости (Савельев В.С., 2006, 2009; Прудков М.И., 2013; Лобанков В.М., 2014; Гагуа А.К. и соавт., 2016; Затевахин И.И. и соавт., 2016). При этом диагноз ОА в больницах ниже областного уровня чаще всего основывается на анализе клинической картины и стандартных показателях лабораторных исследований (Бебуришвили А.Г. и соавт., 2016; Филиппова К.В., Зайцев О.В., 2016; Ключников О.А. и соавт., 2019).

Однако клиническая картина ОА отличается большим разнообразием вариантов, что иногда весьма затрудняет правильную и своевременную диагностику и тактику лечения этого заболевания (Луканов В.В., Фомина И.Г., 2002; Савельев В.С., 2006, 2009; Шапкин Ю.Г. и соавт., 2011; Грошилин В.С. и соавт., 2013; Черкасов М.Ф. и соавт., 2014, 2012; Затевахин И.И. и соавт., 2016; Соколов М.Э. и соавт., 2017; Sinha S., Salter M.C., 2009). Поэтому, несмотря на внедрение в клиническую практику современных методов обследования, повышающих эффективность диагностики ОА, в целом качественного улучшения диагностики этого заболевания не произошло (Тарасов А.Д. и соавт., 2013; Мидленко В.И. и соавт., 2016; Климович И.Н. и соавт., 2018; Шапкин Ю.Г. и соавт., 2019). Удельный вес диагностических ошибок остается высоким, и составляет от 20,8 до 39,4% на догоспитальном этапе и от 7,8 до 29,6 % – в хирургических стационарах (Каманин А.А., 2011; Гагуа А.К. и соавт., 2016). Причем, намного чаще приходится сталкиваться с гипердиагностикой, чем с гиподиагностикой: по статистическим данным из-за боязни пропустить ОА в 10-20% случаев хирургами удаляется неизменный отросток (Шайн Моше, 2003; Филиппова К.В., Зайцев О.В., 2016).

Таким образом, поиск доступных объективных методов повышения эффективности диагностики ОА имеет важное практическое значение для ургентной медицины.

Степень разработанности темы. Несмотря на существенный прогресс медицины до настоящего времени в арсенале практического врача нет критериев, обладающих стопроцентной чувствительностью к ОА. Истинная диагностическая ценность многих аппендикулярных симптомов невелика (Чарышкин А.Л., Яковлев С.А., 2015).

Для повышения эффективности диагностики ОА свыше тридцати лет в мировой хирургической практике используется интегральная шкала диагностики ОА Alvarado (Alvarado A., 1986), включающая подсчет баллов 8 клинических и лабораторных признаков и определение по их сумме индекса острого аппендицита. Однако даже при ее использовании неоправданные аппендэктомии выполняются в 14,3-17,5% (Лоймоева В.С., 2006; Натрошвили, А.Г. и соавт., 2010; Рехачев В.П., 2010; Шатобалов В.К., Рамазанов Р.Р., 2012).

Применение для диагностики компьютерной томографии (КТ) и ультразвукового исследования (УЗИ) снижает долю необоснованных аппендэктомий, но и в этом случае они составляют 3-8% (Ремизов О.В. и соавт., 2017; Совцов С.А. и соавт., 2017). Полезность рутинного УЗИ червеобразного отростка в настоящее время дискутируется (Сахно В.Д. и соавт., 2006; Al-Ajerami Y, 2012). Основными недостатками КТ и УЗИ считают существенную зависимость результатов от квалификации специалиста и наличие соответствующего оборудования в стационаре (Ремизов О.В. и соавт., 2017).

Значительно снизить число «необоснованных» аппендэктомий позволяют современные лапароскопические методики (Ярцев П.А. и соавт., 2010; Хубутия М.Ш. и соавт., 2011; Бебуришвили А.Г. и соавт., 2013, 2011; Акимов В.П. и соавт., 2016; Гуляев А.А. и соавт., 2016; Левин Л.А., 2016; Самсонов В.Т. и соавт., 2017; Турбин М.В. и соавт., 2018; Сажин А.В. и соавт., 2019, 2012), однако их применение ограничено анатомо-топографическими особенностями расположения червеобразного отростка, наличием рубцов после ранее перенесенных полостных операций (Панасюк А.И., Григорьев Е.Г., 2017; Самсонов В.Т. и соавт., 2017; Турбин

М.В. и соавт., 2018).

Для подтверждения или исключения диагноза ОА в хирургической клинике любого звена, в том числе и в сельских лечебных учреждениях наиболее доступным и подходящим дополнением к клинико-инструментальным методам могут стать прикроватные экспресс-тесты на специфические биомаркеры, характерные для ОА или для заболевания с которым приходится дифференцировать ОА. Такие экспресс-тесты на диагностически значимые органоспецифических белки и ферменты, проводимые методом иммуноферментного анализа (ИФА), благодаря доступности и скорости метода, нашли сегодня широкое применение в различных областях медицины для диагностики различных патологических процессов (Уразаева Л.И., Максудова А.Н., 2014; Фадеева Н.А. и соавт., 2018; Bartlett J.A. et al., 2008; Shum A.K. et al., 2013; Charlton R.J. et al., 2014). Применение ИФА специфических белковых маркеров в крови и других биологических жидкостях хирургических больных открывает перед хирургами новые возможности в диагностике (Минаев С.В. и соавт., 2004, 2011; Обедин А.Н., Минаев С.В., 2009; Кчибеков Э.А., 2010; Топчиев М.А и соавт., 2013; Лаврешин П.М. и соавт., 2018, 2016; Sithambaram S. et al., 2015).

С помощью биохимических экспресс-тестов на специфические сывороточные биомаркеры на сегодняшний день уже достаточно достоверно можно отдифференцировать ОА от ранней трубной беременности, острого панкреатита, острого холецистита. Однако, аналогичные достоверные тесты для дифференциальной диагностики ОА и синдрома почечной колики (СПК) не разработаны (Махотин А.А., 2007; Тарасов А.Д. и соавт., 2013). Их разработка тем более важна, так как ОА протекает под маской СПК достаточно часто (в 16-18% случаев) (Русанов А.А., 1979; Седов В.М., 2002; Касимов Р.Р., 2013; Raajanen H. et al., 2002).

В последние годы при острой и хронической патологии почек в крови и моче активно исследуются диагностические возможности специфического белка NGAL (neutrophil

gelatinase-associated lipocalin, липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов, он же – липокалин 2) (Бородулин В.Б. и соавт., 2014; Naase M. et al., 2009), а для диагностики воспалительного процесса в кишечнике интенсивно исследуются фекальные маркеры (Морозова, В.Т. и соавт., 2013; Осипенко М.Ф. и соавт., 2015; Abraham B.P., Kane S., 2012; Coorevits L. et al., 2013; Boschetti. G. et al., 2014).

Все вышеуказанное свидетельствует о том, что широкие диагностические возможности специфических биохимических тестов для дифференциальной диагностики ОА и СПК до настоящего времени остаются неразработанными и не используются в достаточном объеме.

Цель исследования: Улучшение диагностики острого аппендицита путем разработки и внедрения иммуноферментных экспресс-тестов.

Задачи исследования:

1. Изучить особенности ферментного спектра и специфических биомаркеров в крови, моче и фекалиях у больных с различными формами острого аппендицита.
2. Изучить особенности ферментного спектра и специфических биомаркеров в крови, моче и фекалиях у больных, поступивших с синдромом почечной колики различной этиологии.
3. Отобрать диагностически значимые биомаркеры для дифференциальной диагностики острого аппендицита и правосторонней почечной колики.
4. На основе отобранных биомаркеров разработать и внедрить в клиническую практику способ дифференциальной диагностики острого аппендицита и правосторонней почечной колики.

Научная новизна исследования:

1. Впервые комплексно в трех биологических средах (сыворотка крови, моча и каловая эмульсия) у пациентов с ОА и СПК исследованы уровни диагностически значимых ферментов, кишечного (КЩФ) изофермента щелочной фосфатазы, лактоферрина (ЛФ) и липокалина.

2. Впервые для дифференциальной диагностики ОА и СПК проведено исследование кала на кишечный изофермент щелочной фосфатазы (КЩФ).

3. Впервые установлено, что наиболее информативными тестами для дифференциальной диагностики острого аппендицита и почечной колики в сыворотке крови являются КЩФ и НАГ, в моче – липокалин, а в фекалиях – ЛФ и КЩФ, а наиболее технически и экономически доступным – только тест на ЛФ.

4. Разработан новый двойной тест на ЛФ в моче и фекалиях для дифференциальной диагностики ОА и СПК (патент РФ на изобретение №2684727 от 28.02.19).

Теоретическая и практическая значимость работы. Показателем воспалительного процесса в аппендиксе, в том числе и на фоне ОА, являются повышенные уровни фекальных белков, устойчивых к перевариванию в кишечнике: лактоферрина и тонкокишечного изофермента щелочной фосфатазы.

Эффективным и доступным тестом для дифференциальной диагностики острого аппендицита и почечной колики является двойной тест на лактоферрин: выявление у пациента с неясной клиникой ОА методом ИФА ЛФ в фекалиях при отсутствии ЛФ в моче свидетельствует в пользу диагноза «Острый аппендицит» с вероятностью более 99,9%.

При неясной клинической картине ОА и СПК в дополнение к существующим общепринятым критериям дифференциальной диагностики АО предлагается определять одновременно в кале и моче поступившего пациента концентрации лактоферрина и по их отношению – исключать ту или иную нозологическую форму.

Методология и методы исследования.

Методологической основой проведенного исследования послужило системное применение методов научного познания. Сбор данных и обработку полученных результатов диссертант проводил в соответствии с разработанным дизайном исследования. В работе использовались клинические, экспе-

риментальные, инструментальные, лабораторные, иммуноферментные и статистические методы. Исследование соответствовало принципам и правилам доказательной медицины.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. У больных с клинической картиной неосложненного ОА достоверно повышенными биомаркерами в крови являются уровни ЩФ за счет изофермента КЩФ, в моче у больных с ОА достоверных изменений по сравнению со здоровыми людьми не обнаружено, а в фекалиях у них наблюдается повышенное содержание ЩФ и КЩФ, а также ЛФ.

2. У урологических больных, поступивших экстренно с СПК, по сравнению с донорами достоверно повышены: в крови – нейтральная альфа-глюкозидаза (НАГ), ЛФ и липокалин, в моче – ферменты НАГ, а также липокалин и ЛФ, а в кале достоверных изменений по сравнению с контролем не обнаружено.

3. Информативными тестами для дифференциальной диагностики ОА и СПК в сыворотке крови являются КЩФ и НАГ, в моче – липокалин, а в фекалиях – ЛФ и КЩФ. Самым эффективным тестом для дифференциальной диагностики ОА и СПК является тест на ЛФ: выявление у пациента с неясной клиникой ОА методом ИФА ЛФ в фекалиях при отсутствии ЛФ в моче свидетельствует в пользу диагноза ОА с вероятностью более 99,9%. Тест на ЛФ доступен для внедрения в хирургическую клинику любого уровня.

Степень достоверности и апробация результатов исследования. Достоверность результатов проведенного исследования подтверждается достаточным объемом выполненных исследований, использованием строгих критериев включения и исключения при формировании групп сравнения, применением современных методов диагностики и статистического анализа.

Материалы диссертационного исследования докладывались на V Съезде хирургов Юга России с международным участием (Ростов-на-Дону, 2017), на Национальном хирургическом Конгрессе совместно с XX юбилейным съездом РО-

ЭХ (Москва, 2017), на Всероссийской конференции с международным участием «Научная школа по актуальным проблемам плановой и экстренной хирургии» (Геленджик, 2018), на общероссийского хирургического Форуме-2018 с международным участием (Москва, 2018), на XIV Конгрессе Международной ассоциации морфологов (МАМ) «Морфогенез и структурные преобразования органов и тканей в норме и при воздействии антропогенных факторов. Экология и здоровье населения» (Астрахань, 2018), на III Международной конференции Прикаспийских государств «Актуальные вопросы современной медицины» (Астрахань, 2018), на IV Всероссийской конференции молодых ученых: «Современные проблемы хирургии и хирургической онкологии» (Москва, 2019).

Апробация диссертации проведена на межкафедральной конференции кафедр детской хирургии, госпитальной хирургии, факультетской хирургии, общей хирургии с курсом последипломного образования, оперативной хирургии с топографической анатомией, хирургических болезней педиатрического факультета, хирургических болезней стоматологического факультета, онкологии, биологической химии ФГБОУ ВО Астраханского ГМУ Минздрава России и врачей НУЗ «Отделенческая больница на ст. Астрахань-1 АО «РЖД», ГБУЗ АО «Городской клинической больницы №3 им. С.М. Кирова», ГБУЗ АО «Александро-Мариинской областной клинической больницы» г. Астрахани.

Внедрение результатов исследования. Полученные в процессе исследования результаты предложены в виде практических рекомендаций и внедрены в работу хирургических отделений НУЗ «Отделенческая больница на ст. Астрахань-1 АО «РЖД», ГБУЗ АО «Городская клиническая больница №3 им. С.М.Кирова» г. Астрахани и ГБУЗ АО «Александро-Мариинской областной клинической больницы». Материалы диссертации используются на кафедрах: общей хирургии с курсом последипломного образования и факультетской хирургии ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 научных работ, 5 из которых в рецензируемых журналах списка ВАК РФ для диссертаций, разработано учебно-методическое пособие, получен патент на изобретение.

Объём и структура диссертационной работы. Диссертация изложена на 137 страницах компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы исследования», главы результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и библиографического указателя. Список литературы включает 236 источников, из которых 179 работ – отечественных и 67 – иностранных авторов. Работа иллюстрирована 28 рисунками, 21 таблицей, 5 клиническими примерами.

Связь с планом научных исследований

Диссертация выполнена в рамках комплексных тем НИР «Система диагностики, прогнозирование и лечение осложнений при острой хирургической патологии органов брюшной полости», номер государственной регистрации 114070770020 и «Белки-маркеры в диагностике и прогнозировании неотложной хирургической и акушерской патологии», номер государственной регистрации АААА-А16-116071210049-4 в соответствии с планом научно-исследовательской работы ФГБОУ ВО Астраханского ГМУ Минздрава России.

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 14.01.17 – хирургия по области исследований: п. 2. «Разработка и усовершенствование методов диагностики и предупреждения хирургических заболеваний».

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом исследования служили результаты клинического и лабораторного обследования и лечения 114 больных, поступивших экстренно в НУЗ «Отделенческая больница на ст. Астрахань-1 АО «РЖД», ГБУЗ АО «Александро-Мариинская областная клиническая больница» и ГБУЗ АО

«Городская клиническая больница №3» г. Астрахани и образцы крови, сочи и кала 16 здоровых лиц.

Дизайн исследования включал 3 этапа: 1-й этап клинического поиска биохимических различий с нормой в сыворотках крови, моче и фекалиях больных с острым аппендицитом и поступивших на лечение с синдромом почечной колики, 2-й этап отбора значимых биохимических различий между группами больных с острым аппендицитом и урологических больных, поступивших с синдромом почечной колики и разработка тестов для их дифференциальной диагностики и 3-й этап оценки диагностической эффективности разработанных тестов, их апробации, патентования и клинического внедрения.

На первом этапе работы были сформированы три группы пациентов.

Основную первую группу составили 62 больных с острым аппендицитом в возрасте от 18 до 76 лет (средний возраст $45,3 \pm 1,7$ года), в том числе 17 больных с гистологически подтвержденным катаральным, 31 – с флегмонозным и 14 – с гангренозным аппендицитом.

Вторую группу сравнения составили 30 пациентов в возрасте от 18 до 69 лет (средний возраст $39,4 \pm 5,5$ года), доставленных в приемное отделение бригадой скорой помощи с диагнозом «Правосторонняя почечная колика» и болевым синдромом на фоне следующих установленных позднее урологических заболеваний: 17 больных, поступивших с синдромом почечной колики на фоне мочекаменной болезни (МКБ), 10 больных с острым пиелонефритом (ОПн) и 3 пациента с синдромом почечной колики на фоне нефроптоза (Нп).

Критерии включения больных в исследование: больные обоих полов без ограничения по возрасту, поступившие в экстренном порядке с направительным диагнозом «Острый аппендицит»; больные обоих полов без ограничения по возрасту, поступившие в экстренном порядке с синдромом почечной колики и направительным диагнозом «Острый пиелонефрит» или «Почечная колика»; письменное согласие паци-

ента на участие в исследовании; наличие от пациента кала и мочи для анализа.

Критерии исключения пациентов из исследования: пациенты с явными признаками распространенного перитонита, подлежащие экстренному оперативному вмешательству (лапаротомии); острая кишечная непроходимость; обильные желудочно-кишечные кровотечения; рак толстой или прямой кишки в анамнезе; острая кишечная инфекция; обильная диарея неинфекционной природы; инфекционно-токсический шок; тяжелые хронические декомпенсированные заболевания; беременность, осложненная, гестозом тяжелой степени.

Контрольная группа включала 6 физически здоровых студентов-волонтеров Астраханского ГМУ в возрасте 18-24 года и 10 доноров обоего пола в возрасте от 25 до 56 лет, согласившихся в день сдачи крови одновременно сдать на исследование кал и мочу.

На третьем завершающем этапе работы с целью апробации и оценки диагностической эффективности разработанного способа дифференциальной диагностики ОА и СПК постепенно формировалась третья группа больных с неясной клинической картиной ОА. В период с 2017 по 2019 г. в приемных отделениях трех дежурных больниц г. Астрахани были обследованы образцы кала и мочи от 22 таких больных.

Общее количество образцов сыворотки крови, мочи и кала от 114 больных и 16 здоровых лиц составило 368.

Клиническое обследование больных осуществлялось с помощью стандартных клинических, лабораторных и биохимических методов обследования, необходимые в хирургии: оценки анамнеза, физикальных данных, по показаниям рентгенографии и УЗИ органов брюшной полости и забрюшинного пространства, ЭГДФС, МСКТ. Для уточнения диагноза по показаниям выполнялась восходящая урография или диагностическая лапароскопия.

Фекальную эмульсию для иммуноферментного анализа (ИФА) готовили ex tempore после забора кала у поступившего пациента. Образцы сывороток, мочи и каловой эмульсии

тестировались на общую концентрацию белка, активность ферментов АЛТ, АСТ, ЛДГ, ГГТП, ЩФ и ее интестинального изофермента (КЩФ), лизоцима (ЛЗЦ), нейтральной α -глюкозидазы (НАГ), уровни острофазовых белков липокалина-2 (NGAL) и лактоферрина (ЛФ).

Измерение ферментативной активности осуществляли на автоматическом биохимическом анализаторе «Microlab» с использованием стандартных наборов («Vitalab», Нидерланды) в соответствии с рекомендациями производителя. Активность КЩФ определяли по методике определения общей ЩФ после добавления к образцам 5 ммоль/л L-гомоаргинин, являющегося специфическим ингибитором всех изоферментов ЩФ, кроме КЩФ. Активность ЛЗЦ в биологическом материале определяли колориметрически с тест-культурой микрококка. Активность НАГ оценивали модифицированным методом И.С. Лукомской по нарастанию концентрации глюкозы в присутствии 1% субстрата – мальтозы.

Концентрации ЛФ определяли с помощью набора реагентов для ИФА Лактоферрин – стрип ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск), чувствительность метода 20 нг/мл (2 МЕ/мл). Количественное определение липокалина-2 (NGAL) проводили методом твердофазного ИФА на стандартных 96-луночных планшетах «Human Lipocalin-2/NGAL ELISA» («BioVendor Laboratory Medicine Inc.», Чехия). Чувствительность метода 1 нг/мл.

Для статистической обработки результатов исследования применяли программы «Statistica 6.1.» (StatSoft. Inc.) и Excel-2003 (Microsoft). Определяли среднее значение (M), стандартную ошибку среднего (m), объем выборки (n). При отсутствии нормального распределения цифровые данные представлялись в виде медианы (Me) и межквартильного интервала (Q_{25} - Q_{75}). Достоверность различий между сравниваемыми показателями определяли по критерию U Вилкоксона-Манна-Уитни. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,01$. Для оценки диагностической информативности тестов определяли их чувствительность и специфичность ме-

тодом ROC-анализа (Receiver Operator Characteristic) с использованием пакета Deductor Studio Pro версии 5.2.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Особенности ферментного спектра и уровней ЛФ и липокалина в сыворотках крови, моче и фекалиях больных с острым аппендицитом при поступлении

Результаты исследования показали, что у больных с клинической картиной острого аппендицита из восьми исследованных ферментов и двух белков острой фазы по сравнению с контрольной группой доноров и студентов-волонтеров достоверно ($p < 0,01$) повышены: в крови у пациентов с острым катаральным аппендицитом (подгруппа ОАк) – АСТ, ЛДГ и КЩФ; с острым флегмонозным аппендицитом (подгруппа ОАф) и с острым гангренозным аппендицитом (подгруппа ОАг) – все ферменты кроме НАГ. Уровень ЛФ в крови у пациентов с ОАк от контроля не отличался, но был достоверно повышен при двух других формах ОА. Сывороточные уровни липокалина ни в одной подгруппе пациентов с ОА не отличались от здоровых волонтеров и доноров.

При исследовании *мочи* здоровых людей на автоматическом анализаторе установлено, что в ней отсутствуют печеночные ферменты АЛТ, АСТ, ГГТП, но обнаружена ферментативная активность ЛДГ, ЩФ, НАГ и ЛЗЦ. У пациентов с ОАк активность ни одного из четырех этих ферментов мочи не отличалась от их активности в контрольной группе. У пациентов с Оаф и ОАг в моче достоверно повышены ЩФ и НАГ. В моче доноров и пациентов с ОА методом ИФА уровни липокалина и ЛФ выявляются в одинаково низких пороговых концентрациях.

При исследовании *фекалий* пациентов с ОА и контрольной группы волонтеров и доноров в их пробах обнаружены ЛЗЦ, ЩФ и КЩФ, причем при любой форме ОА наблюдается достоверное ($p < 0,01$) повышение уровней этих ферментов и обоих БОФ (ЛФ и липокалина) по сравнению с контролем.

Особенности ферментного спектра и уровней ЛФ и липокалина в сыворотках крови, моче и фекалиях больных, поступивших с синдромом почечной колики

Результаты определения активности семи ферментов, изофермента КЩФ острофазовых белков ЛФ и липокалина в крови у пациентов, поступивших с синдромом почечной колики (СПК) различной этиологии показали достоверное увеличение активности всех ферментов, кроме ГГТП и КЩФ у больных, поступивших с острым пиелонефритом (подгруппа ОПн). Наоборот, у пациентов, поступивших в приемное отделение с синдромом почечной колики на фоне МКБ, достоверно выше контроля активность ферментов АЛТ, АСТ, ЛДГ и НАГ. Приступ почечной колики, обусловленный нефроптозом (подгруппа Нп), достоверного изменения активности сывороточных уровней ферментов по сравнению с контрольной группой не дает. Для всех пациентов с СПК на фоне МКБ и ОПн по сравнению с контролем характерно достоверное ($p < 0,01$) повышение средних сывороточных концентраций ЛФ и липокалина, а у трех пациентов с СПК на фоне Нп обнаружен достоверно повышен только уровень липокалина.

Результаты определения активности ферментов и БОФ в моче у пациентов, поступивших с синдромом почечной колики, не выявили различий с донорами при Нп, при МКБ в моче статистически значимо повышены ЛДГ, ЩФ и НАГ, а при ОПн кроме этих трех ферментов еще ЛЗЦ. В моче у всех пациентов с СПК достоверно ($p < 0,01$) повышен ЛФ и липокалин (в 5,8 и 6 раз соответственно при МКБ), (в 30 и 8,5 раза – ОПн) и 4,5 и 2,8 раза – при Нп).

В фекальной эмульсии пациентов, поступивших с СПК, также как и у доноров обнаружен ЩФ и КЩФ, но достоверных отличий от контрольной группы не обнаружено. Уровни фекального ЛФ, обнаруживаемого у больных с СПК методом ИФА соизмеримы с контрольными цифрами, а липокалин отсутствует в фекальной эмульсии доноров и при Нп, но обнаруживается в пороговых концентрациях у 1/3 больных из групп МКБ и ОПн.

Поиск диагностически значимых различий в крови, моче и фекалиях у больных с острым аппендицитом и синдромом почечной колики

Полученные результаты средних величин диагностически значимых ферментов и БОФ в сыворотках крови пациентов с ОА и СПП объединены в общие таблицы 1 (показатели в сыворотке крови), 2 (в моче) и 3 (в фекальной эмульсии) и представлены в виде относительных цифр в % к контролю. Оценивали попарно достоверность различий между подгруппами ОАк и Нп, между ОАф и МКБ и между ОАг и ОПн.

Таблица 1 – Сравнение уровней исследованных биохимических параметров в сыворотке крови у пациентов с острым аппендицитом различной степени тяжести и больных, поступивших с синдромом почечной колики различной этиологии

Параметр	в % к контролю					
	ОАк n=17	ОАф n=31	ОАг n=14	Нп n=3	МКБ n=17	ОПн n=10
АЛТ МЕ/л	133	167	270	129	205	262
АСТ МЕ/л	202	301*	336	149	175*	285
ЛДГ МЕ/л	158	160*	245	144	221*	245
ГГТП МЕ/л	123	210*	254*	118	146*	167*
ЩФ МЕ/л	150	282*	350	144	161*	300
КЩФ МЕ/л	191*	268*	350*	121*	124*	142*
НАГ ммоль/л	118	136*	130*	170	184*	286*
ЛЗЦ МЕ/л	110	223	215	119	131	155
ЛФ нг/мл	119	285*	272	107	139*	323
Липокалин нг/мл	97*	134*	168*	167*	412*	613*

Примечание: достоверные различия ($p < 0,01$) с контрольной группой выделены **полужирным**, * – достоверные различия ($p < 0,01$) между сравниваемыми группами ОАк - Нп, ОАф – МКБ или ОАг – ОПн

На основании результатов проведенного исследования наиболее информативными для дифференциальной диагностики ОА и СПК в сыворотке крови представляются три параметра: КЩФ (активность возрастает при ОА), НАГ и липокалин (уровень возрастает при СПК).

Таблица 2 – Сравнение уровней исследованных биохимических параметров в моче у пациентов с острым аппендицитом различной степени тяжести и больных, поступивших с синдромом почечной колики различной этиологии

Параметр	в % к контролю					
	ОАк n=17	ОАф n=31	ОАг n=14	Нп n=3	МКБ n=17	ОПн n=10
ЛДГ МЕ/л	83	108*	154	96	176*	200
ЩФ МЕ/л	108	173	223	85	169	156
НАГ ммоль/л	115*	169*	277*	508*	1224*	2108*
ЛЗЦ МЕ/л	24	29	43	33	53	100
ЛФ нг/мл	86*	104*	121*	450*	579*	2996*
Липокалин нг/мл	124*	136*	192*	284*	599*	846*

Таблица 3 – Сравнение уровней исследованных биохимических параметров в фекальной эмульсии у пациентов с острым аппендицитом различной степени тяжести и больных, поступивших с синдромом почечной колики различной этиологии

Параметр	в % к контролю					
	ОАк n=17	ОАф n=31	ОАг n=14	Нп n=3	МКБ n=17	ОПн n=10
ЩФ МЕ/л	142*	172*	236*	107*	102*	92*
КЩФ МЕ/л	183*	186*	226*	104*	113*	109*
НАГ ммоль/л	0	0	14	0	0	0
ЛЗЦ МЕ/л	71	84	93	33	53	30
ЛФ нг/мл	311*	561*	750*	70*	83*	89*
Липокалин нг/мл	0	42	86	0	29	30

В моче наиболее информативным для дифференциальной диагностики представляются также три параметра: НАГ, ЛФ и липокалин (концентрации у всех трех возрастают при СПК, но не при ОА).

В фекалиях наиболее информативными представляются три параметра: ЩФ, КЩФ и ЛФ (уровни возрастают при ОА, но не при СПК).

Отбор и определение диагностических биохимических показателей в крови, моче и фекалиях у больных с острым аппендицитом и приступом почечной колики

Для ROC-анализа отобраны следующие значимые показатели сыворотки крови: s-КЩФ, s-НАГ и s-липокалин, в моче – u-НАГ, u-ЛФ и u-липокалин, а в фекальной эмульсии – f-КЩФ, f-ЛЗЦ и f-ЛФ. Информативными тестами, подтверждающими диагноз ОА в сыворотке крови являются уровни КЩФ выше 3 МЕ/л (специфичность теста 80,6%) и в фекалиях – ЛФ выше 7800 нг/г и КЩФ выше 8 МЕ/г кала (специфичность – 97,9% и 94,1% соответственно). Информативными тестами, подтверждающими СПК в сыворотке крови является уровни НАГ выше 4,7 МЕ/л, а в моче – липокалин в концентрации выше 15 нг/мл, (специфичность тестов 79,2% и 93,3% соответственно). В фекалиях специфичных для СПК биомаркеров не выявлено.

Таким образом, по результатам ROC-анализа самыми высокоэффективными системами дифференциальной диагностики острого аппендицита и правосторонней почечной колики являются тесты на u- липокалин, u-ЛФ, f-КЩФ и f-ЛФ. Поскольку в этом списке дважды встречается ЛФ, мы решили объединить определение лактоферрина в фекалиях и моче в единый двойной тест. Результаты ROC-анализа подтвердили максимальную эффективность использования отношения f-ЛФ/u-ЛФ для дифференциальной диагностики ОА и СПК.

Результаты применения двойного теста на лактоферрин у больных с неясной клинической картиной

Разработан, запатентован и внедрен в клиническую практику способ дифференциальной диагностики ОА и СПК, основанный на одновременном измерении концентрации ЛФ в фекалиях и моче у пациентов с ОА (патент РФ на изобретение № 2684727). Параллельное определение концентрации ЛФ в фекалиях и моче пациентов с неясной клинической картиной проведено на контингенте больных мужского и женского пола в возрасте от 19 до 65 лет. В случае обнаружения

концентрации фекального лактоферрина выше 7800 нг в пересчете на 1 грамм фекалий, а концентрации лактоферрина мочи от 20 до 60 нг/мл подтверждали диагноз «острый аппендицит» и исключали острую правостороннюю патологию почек. Отрицательный результат теста на ЛФ в моче приравнивался к чувствительности метода иммуноферментного анализа равной 20 нг/мл.

Разработанный способ позволил уточнить диагноз у 22 больных с неясной клинической картиной острого аппендицита: высокий уровень ЛФ в кале, при отсутствии, умеренном или высоком содержании ЛФ в моче обнаружен у 15 больных, и диагноз ОА подтвержден в 100% случаев. Высокий уровень ЛФ в моче, при низкой концентрации ЛФ в кале обнаружен у 6 пациентов с подтвержденной урологической патологией. Низкие уровни ЛФ в кале и моче обнаружены у одной пациентки, у которой впоследствии установлен диагноз «острый сальпингит». Специфичность теста для подтверждения диагноза ОА или клинического синдрома почечной колики составила 95,5%.

ВЫВОДЫ

1. Проведенный иммуноферментный анализ выявил, что у больных с клинической картиной острого аппендицита наиболее информативными показателями являются: в сыворотках крови - изофермент кишечной щелочной фосфатазы (КЩФ); в фекалиях - лактоферрин (ЛФ) и КЩФ. В моче специфических биомаркеров не выявлено.
2. Иммуноферментный анализ у пациентов с синдромом почечной колики (СПК) различной этиологии определил, что наиболее информативными показателями являются: в сыворотках крови – нейтральная альфа-глюкозидаза (НАГ), а в моче - липокалин. В фекалиях специфических биомаркеров не обнаружено.
3. По результатам ROC-анализа наиболее диагностически значимыми тестами для острого аппендицита являются: в сыворотке крови - КЩФ выше 3 МЕ/л (специфичность теста 80,6%), в фекалиях - ЛФ выше 7800 нг/г и КЩФ выше 8 МЕ/г

кала (специфичность - 97,9% и 94,1% соответственно). Информативными тестами, подтверждающими СПК, являются: в сыворотке крови - НАГ выше 4,7 МЕ/л, а в моче - липокалин выше 15 нг/мл (специфичность тестов 79,2% и 93,3% соответственно). Одновременное определение ЛФ в моче и фекалиях у больных с ОА и СПК повышает эффективность теста до 99,9%.

4. Внедренный в клиническую практику способ дифференциальной диагностики острого аппендицита и синдрома почечной колики различной этиологии (патент РФ на изобретение № 2684727) позволил уточнить диагноз у 21 из 22 больных с неясной клинической картиной. Специфичность теста для подтверждения диагноза ОА или СПК составила 95,5%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При неясной клинической картине острого аппендицита в дополнение к существующим общепринятым критериям дифференциальной диагностики острого аппендицита и синдрома почечной колики рекомендуется в кале и моче поступившего пациента проводить одновременное определение концентрации лактоферрина методом иммуноферментного анализа. Обнаружение ЛФ в концентрации 7800 нг и более в пересчете на 1 грамм кала (78 нг/мл фекальной эмульсии) подтверждает диагноз острого аппендицита.

2. Подтвердить диагноз ОА или СПК можно визуально при условии, если в соседние лунки планшета для иммуноферментного анализа на лактоферрин (ИФА-ЛФ стрип) внести мочу и разведенный в 100 раз кал пациента с неясной клинической картиной острого аппендицита. Через 15-20 минут по более интенсивной окраске в лунке планшета или стрипа для ИФА подтверждается приоритетный диагноз. Фекальная эмульсия готовится ex tempore путем втягивания в наконечник шприца 0,1 г (мл) оформленного кала или жидких фекалий и 10 мл физиологического раствора.

3. Из трех тестов на КЩФ, липокалин и ЛФ самым эффек-

тивным, дешевым и простым в исполнении является двойной тест на ЛФ, доступный для внедрения в хирургическую клинику любого уровня.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Зурнаджянц, В.А. К вопросу о значении теста на α 2-макроглобулин для своевременной диагностики тяжести воспалительного процесса в поджелудочной железе / В.А. Зурнаджянц, Э.А. Кчибеков, А.В. Коханов, М.А. Сердюков, Алексашина Д.С., **Луцева О.А.** // **Медицинский вестник Северного Кавказа.** – 2016. – Т.ХІ. – №3. – С. 405-408.
2. Коханов, А.В. Плацентарная щелочная фосфатаза и научное наследие профессора Р.И. Асфандиярова / А.В. Коханов, А.Е. Сухарев, И.С. Ямпольская, Ю.А. Кривенцев, **О.А. Луцева** // **Астраханский медицинский журнал.** – 2013. – №1. – С. 133-137.
3. Коханов, А.В. Уровни сывороточного ферритина и термостабильной фракции альбумина в крови у больных аппендикулярным перитонитом / А.В. Коханов, Э.А. Кчибеков, **О.А. Луцева**, А.А. Мусагалиев // **Современные проблемы науки и образования.** – 2016. № 6. С. 78-85 (Электронный журнал); URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25588> (дата обращения: 30.01.2017).
4. Серебряков, А.А. Активность некоторых ферментов при моделировании повреждения почки в эксперименте / А.А. Серебряков, О.В. Мусатов, **О.А. Луцева**, А.В. Коханов, С.А. Зурнаджан // **Современные проблемы науки и образования.** – 2018. – №3. (Электронный журнал); URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=27717> (дата обращения: 23.08.2018).
5. Луцева, О.А. Уровни лактоферрина в сыворотке крови и фекальном экстракте при некоторых воспалительных заболеваниях кишечника / **О.А. Луцева**, А.В. Коханов, М.Ю. Воронкова, Р.Н. Иримиа, Я.В. Зеленцова // **Современные проблемы науки и образования.** – 2019. – №1. (Электронный журнал); URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=28541> (дата обращения: 14.02.2019).
6. Кчибеков, Э.А. Разработка технологии дифференциальной диагностики абдоминальной хирургической патологии / Э.А. Кчибеков, **О.А. Луцева**, А.А. Мусагалиев, А.В. Калиев, И.Р. Масленников // Материалы заочной научно-практической конференции с международным участием: «Фармацевтические науки: от теории к практике» (г. Астрахань, 25 ноября 2016 г.). – Астрахань: Астраханский государственный университет, 2016. – С. 209-211.

7. Луцева, О.А.. Значение сывороточного альбумина как фактора прогноза развития перитонита / **О.А. Луцева**, А.А. Мусагалиев, А.А. Серебряков, Э.А. Кчибеков, А.В. Коханов // Тезисы Национального хирургического конгресса совместно с XX юбилейным съездом РО-ЭХ" (г. Москва, 4-7 апреля 2017 г.). / Альманах Института хирургии им. А.В. Вишневского. – 2017. – №1. – С. 611-612.
8. Луцева, О.А.. Перспективы разработки прогностических тестов на органоспецифические белки / **О.А. Луцева**, Р.А. Бисалиева, А.А. Серебряков, А.В. Коханов, А.А. Мяснянкин // Материалы Международного научного конгресса «Медицинские и биологические науки: достижения и перспективы», 25-26 апреля 2018 г. – Дар-эс-Салам, Танзания: Saint Joseph University in Tanzania (SJUIT), 2018. – P. 398-401.
9. Луцева, О.А. Возможности сывороточных индикаторных ферментов в дифференциальной диагностике атипичных форм острого аппендицита / **О.А. Луцева**, В.А. Зурнаджянц, Э.А. Кчибеков, А.А. Мусагалиев, А.В. Коханов // **Вестник хирургической гастроэнтерологии**. – 2018. – №1. – С. 54-55.
10. Луцева, О.А. Иммуногистохимическое определение локализации органоспецифического антигена в нормальной и поврежденной почечной ткани / **О.А. Луцева**, А.В. Коханов, А.А. Серебряков // материалы XIV Конгресса Международной ассоциации морфологов (МАМ) «Морфогенез и структурные преобразования органов и тканей в норме и при воздействии антропогенных факторов. Экология и здоровье населения» (Астрахань, 19-22 сентября 2018 г.). / **Морфология**. – 2018. – Т. 153, №3. – С. 173.
11. Зурнаджянц, В.А. Фермент нейтральная α -глюкозидаза в дифференциальной диагностике острого аппендицита под маской правосторонней почечной колики / В.А. Зурнаджянц, Э.А. Кчибеков, **О.А. Луцева**, А.В. Коханов, А.А. Серебряков, М.Ю. Воронкова // Материалы III Международной конференции Прикаспийских государств «Актуальные вопросы современной медицины» (г.Астрахань, 4-5 октября 2018 г.). – Астрахань: Изд-во Астраханского государственного медицинского университета, 2018. – С. 71-73.
12. Луцева, О.А. Способ диагностики острой правосторонней патологии почек, симулирующей клинику острого аппендицита . Патент RU 2684727 C1, МПК G01N 33/48) / А.В. Коханов, А.А. Серебряков, **О.А. Луцева** // Заявка № 2018130943, 27.08.18. Опубликовано 12.04.19. Бюллетень № 11.
13. Луцева, О.А. Активность ферментов лизоцима и термостабильной щелочной фосфатазы при различных воспалительных заболева-

ниях желудочно-кишечного тракта / **О.А. Луцева**, А.В. Коханов, А.А. Мусагалиев, М.Ю. Воронкова // Научное обозрение. Медицинские науки. – 2019. – №1. – С. 26-31.

14. Коханов, А.В. Анализ кала в дифференциальной диагностике абдоминальной патологии / А.В. Коханов, П.А. Иванов, М.Ю. Воронкова, **О.А. Луцева**.– Астрахань, ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ, 2019. – 76 с.

15. Закаев, К.Ю. Фекальный лактоферрин как биомаркер качества дренирования толстокишечной опухолевой непроходимости / К.Ю. Закаев, В.А. Журнаджьянц, Э.А. Кчибеков, **О.А. Луцева**, А.В. Коханов // тезисы IV Всероссийской конференции молодых ученых: "Современные проблемы хирургии и хирургической онкологии" (г. Москва, 24-25 января 2019 г.). – М.: Институт хирургии им. А.В. Вишневского, 2019. – С. 112-113.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЛТ	аланинаминотрансфераза
АСТ	аспартатаминотрансфераза
ГГТП	гамма-глутамилтранспептидаза
ИФА	иммуноферментный анализ
КТ	компьютерная томография
КЩФ	кишечная изоформа щелочной фосфатазы
ЛДГ	лактатдегидрогеназа
ЛЗЦ	лизосим
ЛФ	лактоферрин
МКБ	мочекаменная болезнь
НАГ	нейтральная α -глюкозидаза
ОА	острый аппендицит
ОАф	острый аппендицит флегмонозный
ОКН	острая кишечная непроходимость
ОПн	острый пиелонефрит
СПК	синдром почечной колики
УЗИ	ультразвуковое исследование
ЩФ	щелочная фосфатаза
AUC	Area Under Curve (площадь под ROC-кривой – отражает чувствительность и специфичность теста)
NGAL	липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов
ROC-анализ	Receiver Operator Characteristic (графический метод оценки диагностической чувствительности и специфичности теста)

ЛУЦЕВА Оксана Алексеевна

ЭФЕКТИВНОСТЬ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА
ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ОСТРОГО
АППЕНДИЦИТА И ПОЧЕЧНОЙ КОЛИКИ

14.01.17 – Хирургия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Подписано в печать
Набор компьютерный. Гарнитура Times. Усл. п.л. 1,0
Тираж 100 экз. Заказ №

Издательство ФГБОУ ВО «Астраханский государственный
медицинский университет» Минздрава России
414000, г.Астрахань, ул. Бакинская, 121