

ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

ПРОЕКТ

**Совершенствование способов идентификации микрокристаллических
депозитов в суставном хряще и других биологических тканях**

Руководитель проекта

КАБАЛЫК МАКСИМ АЛЕКСАНДРОВИЧ

Владивосток 2014

Соответствие проекта тематике заявленной научной платформы

В научно-исследовательском проекте рассматривается фундаментальная проблема идентификации микрокристаллов в суставном хряще и других биологических тканях, которая решается с привлечением инновационного способа.

Актуальность исследования

История изучения микрокристаллических артропатий (МА) берет свое начало в 80х годах 19 века, когда развернулась дискуссия о целесообразности использования термина «uric acid diathesis» (мочекислый диатез). Во время дискуссии был выдвинут основополагающий тезис о том, что кристаллы мочевой кислоты являются уникальной причиной развития подагры. Особый интерес медицинской общественности вызвала статья Уео I.B., опубликованная в 1888 году, в которой автор впервые систематически излагает накопленные факты метаболизма и патологической роли мочевой кислоты. В 1903 году Bennet E.H. делится результатами аутопсии пожилого мужчины в суставном хряще которого были обнаружены ромбовидные кристаллы немочекислый природы. Это было первое описание пирофосфатной артропатии.

В настоящее время группа МА включает в себя артриты, ассоциированные не только с мочекислым натрием, пирофосфатом кальция, но и с гидроксипатитом алюминия, кристаллами основного фосфата кальция. Очевидно, что эта категория патологии суставов будет постоянно расширяться за счет идентификации новых кристаллов-участников, и связано это, прежде всего, с научно-техническим прогрессом в области технологий анализа кристаллических структур. В условиях особой актуальности инновационных подходов к ранней (возможно доклинической) диагностики, особенно важно иметь отчетливое представление о существующих методах и возможности их использования в клинической практике. Последние

рекомендации Европейской антиревматической лиги по терминологии и ведению больных с пирофосфатной артропатией предполагают в качестве основного диагностического стандарта использование поляризационной микроскопии синовиальной жидкости. Вместе с тем появился целый ряд точных и информативных методов обнаружения кристаллов в синовиальной жидкости и тканях сустава превосходящих по своим возможностям поляризационную микроскопию, ультразвуковое исследование и стандартную рентгенографию.

Научный коллектив

Кабалык Максим Александрович – ассистент кафедры факультетской терапии ГБОУ ВПО ТГМУ Минздрава России.

Конкурентные преимущества проекта

В настоящее время отсутствуют фундаментальные инновационные технологии изучения процессов биоминерализации. Световая поляризационная микроскопия отличается рядом известных недостатков и не может удовлетворить возрастающих с исследовательских потребностей.

Инновационность

Описание разработки

Исследование проводилось по собственной методике, разработанной автором диссертации и соавторами А.И. Дубиковым и Т.Ю. Петрикеевой на кафедре факультетской терапии ГБОУ ВПО «ТГМУ Минздрава России» (Патент РФ №2510504). Основная часть исследования проводилась в лаборатории рентгеновских методов анализа Института геологии

Дальневосточного отделения Российской академии наук (заведующий лабораторией – к.г.-м.н. А.А. Карабцов).

Материалом для исследования послужили головки бедренных костей, полученных при тотальном эндопротезировании тазобедренных суставов у включённых в исследование пациентов. После резекции головку бедренной кости опускали в физиологический раствор хлорида натрия на 5-10 секунд для удаления биологических жидкостей и возможных загрязнений. Затем образец герметично упаковывали в полиэтиленовые ёмкости объёмом 500 мл, маркировали и доставляли в лабораторию при температуре от 0 до 6,5 оС. Срок хранения образцов не превышал 20 суток при температуре не выше - 5оС.

Подготовка к исследованию для рентгеновской дифракции и электронно-зондового исследования включала снятие с образца участка хряща. Препарирование хряща осуществляли скальпелем однократного применения производства Apexmed, изготовленного из: лезвие - нержавеющей сталь, ручка – полистирол. Для анализа брали участок ткани хряща размером от 0,3 до 1 см. Полученный материал подвергали высушиванию в струе горячего воздуха с температурой 40-55 оС до полного высушивания (в среднем в течение 5 минут). Высушенный образец хряща подвергался исследованию и/или хранению для последующего электронно-зондового анализа.

Рентгеноструктурный анализ осуществляли на приборе для рентгеновской дифрактометрии D8 DISCOVER ("Bruker AXS GmbH", Германия) в соответствии с инструкцией по эксплуатации и рекомендациями по технике безопасности. Исследуемый образец фиксировали на пластиковую подложку с помощью некристаллического латексного клея. Образец с подложкой помещали в прибор и фиксировали на держателе. При помощи видеорегистратора и ручного пульта устанавливали область анализа так, чтобы лазер и перекрестие камеры находились в одной точке, которая будет подвергаться измерению (рисунок 1).

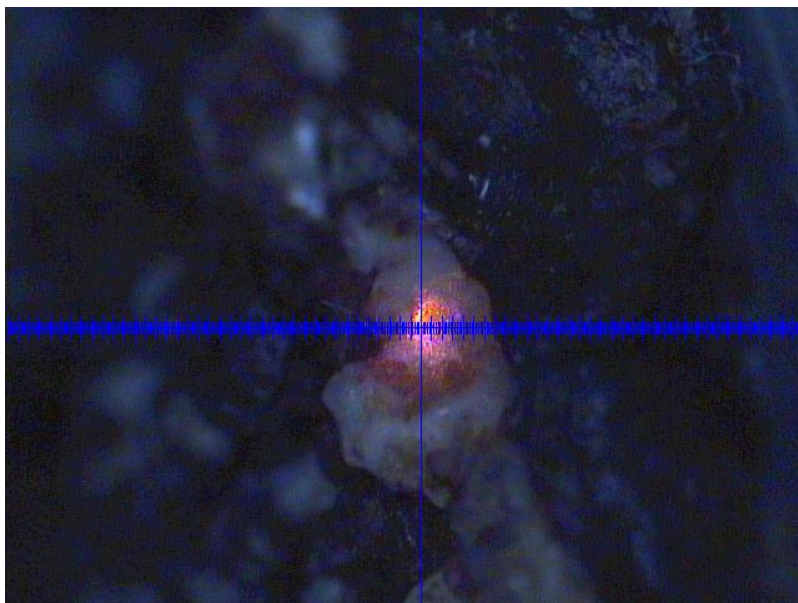


Рисунок 1. Внешний вид установки видеорегистратора в области анализа
Примечание. Увеличение $\times 10$.

Затем, с помощью программы GADDS (General Area Detector Sistem V4.1.27) устанавливали параметры анализа: 3 фрейма, углы 2-Theta=15 deg, Omega=7,5 deg, количество секунд от 150 до 3000 в зависимости от сложности исследования. Количество осей, по которым будет идти измерение, оставляли по умолчанию, осцилляцию образца также выбирали по необходимой амплитуде в зависимости от поставленной задачи и сложности исследования.

После установки базовых параметров исследования указывали имя файла, в котором будут сохраняться данные исследования. В результате произведенных измерений получают 3 фрейма с дифрактограммами, их интегрировали по площади с помощью GADDS и сохраняли данные. После чего «склеивали» проинтегрированные фреймы в программе «Marge» и получали файл с кристаллической спектрограммой (рисунок 2), готовый для анализа, который проводили в программном пакете «EVA».

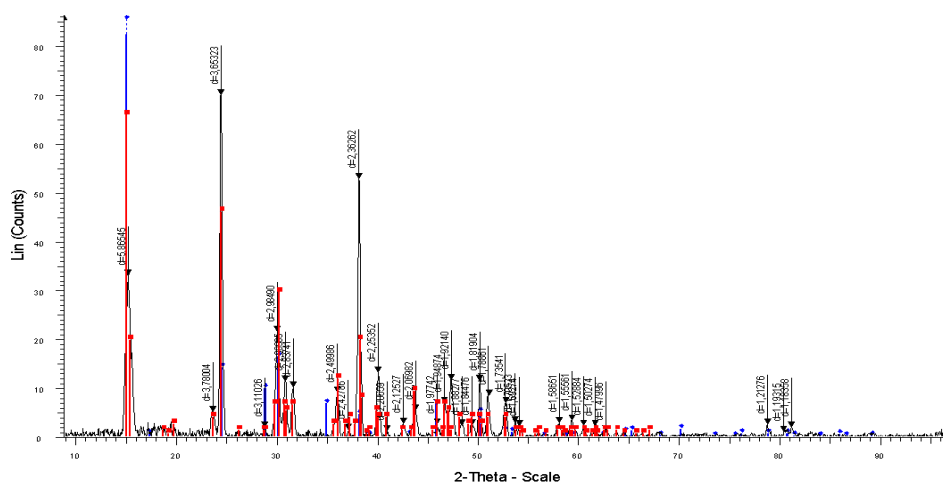


Рисунок 2. Спектрограмма кристалла

Примечание. Стрелками выделены значимые пики. Красным обозначены пики соответствующие гидроксиапатиту. Синим цветом обозначены пики соответствующие кальциту.

На полученной дифрактограмме выделяли значимые пики и сравнивали по базе данных известных спектров кристаллов. По результатам анализа программа определяла тип и химическую формулу кристалла в случае положительного результата.

Электронно-зондовое исследование

На следующем этапе анализ проводили с помощью электронно-зондового исследования на растровом электронном микроскопе (РЭМ) JSM 6490 LV (“JEOL”, Япония) с энергодисперсионным рентгеновским спектрометром (ЭРС) INCAx-sight (“JEOL”, Япония) в соответствии с инструкцией по эксплуатации и усовершенствованиями [Williams D. B. Et al, 1996; Newbury D. E. 2002]. В качестве дополнительной подготовки к электронно-зондовому исследованию на предварительно высушенный и закреплённый на эквицентрический предметный столик образец хряща напыляли углеродную плёнку в условиях высокого разряда. Для этих целей использовали вакуумную напылительную установку JEE-4B.

Подготовленный таким образом образец устанавливали в отверстия манипулятора, который затем устанавливали через шлюз в микроскоп. В программной среде, ассоциированной с микроскопом устанавливали пользовательские настройки: систему откачки с высоким вакуумом, ускоряющее напряжение электронов от 0,3 до 15 кВ, автостигматор, автоматический контроль пушки. На экране монитора получали изображение образца, как показано на рисунке 3.

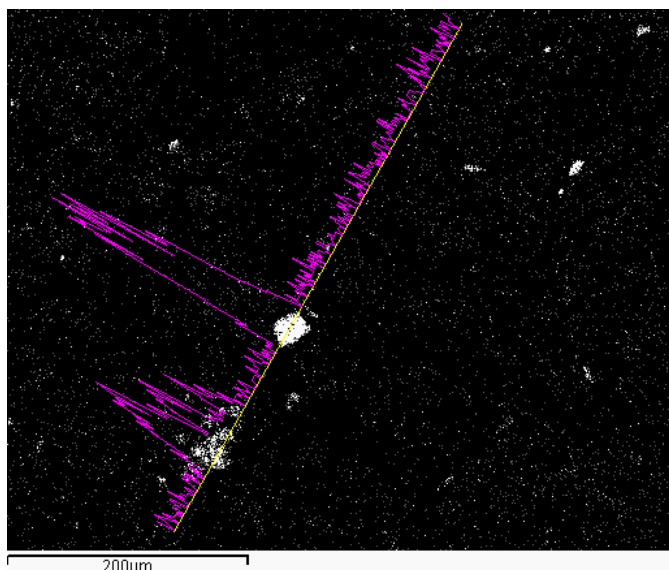


Рисунок 3. Карта-микрофотография

Примечание. Увеличение $\times 60$.

Для структурного анализа образцов использовали ЭРС. Получали снимки-метки с анализом интеграции по площади образца отдельных элементов. В нашем случае элементами интереса являлись углерод, кислород, водород, кальций, фосфор (рисунок 4).

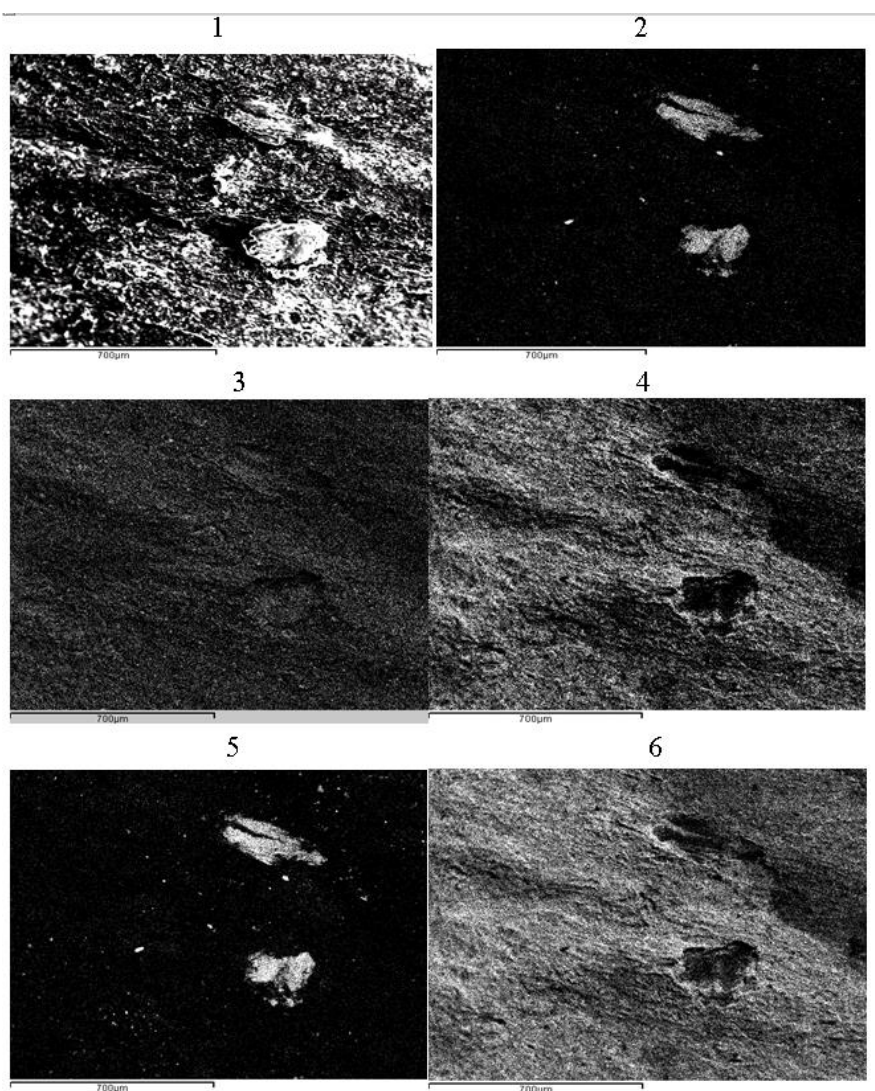


Рисунок 4. Картирование области интереса по химическим элементам

Примечание. На фрагментах 1 – изображен общий вид области анализа; 2 – распределение фосфора по площади; 3 – распределение кислорода по площади; 4 - распределение натрия по площади; 5 - распределение кальция по площади; 6 - распределение углерода по площади. Увеличение $\times 50$.

В совокупности по снимкам объекта и его элементарного портрета судили о типе инкрустации кристаллами хряща. Наблюдали два основных типа инкрустации: очаговый (рисунок 6) и диффузный (рисунок 7). О типовой и морфологической структуре хряща судили по энергодисперсионным спектрам, как показано на рисунке 5.

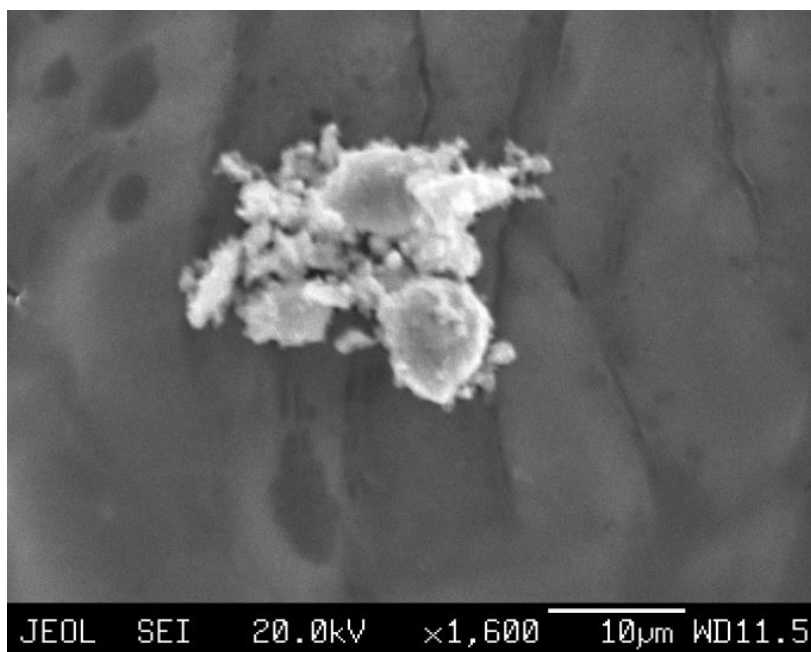


Рисунок 5. Очаговый тип инкрустации суставного хряща кристаллами (депозит гидроксиапатита)

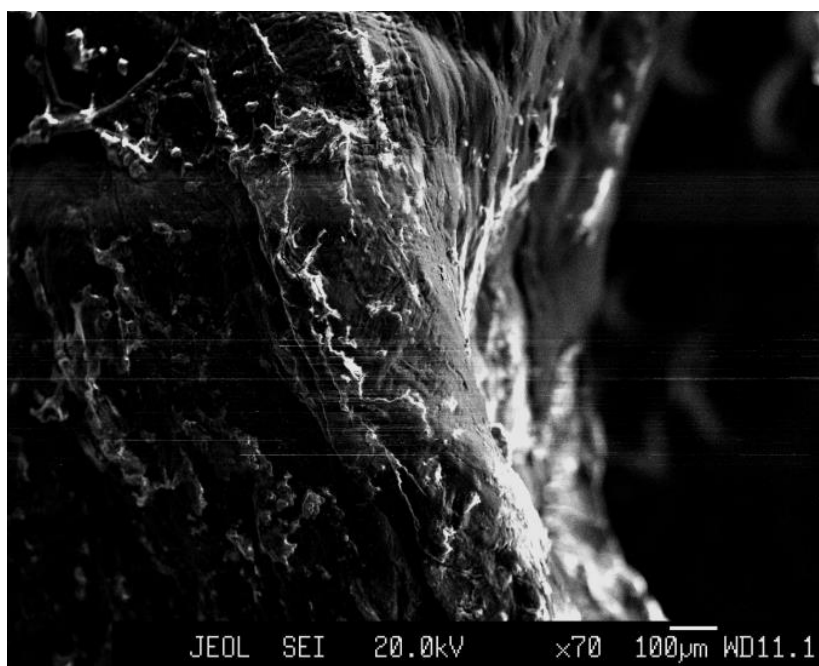


Рисунок 6. Диффузный тип инкрустации суставного хряща кристаллами (смешанный депозит: гидроксиапатит и кальцит)

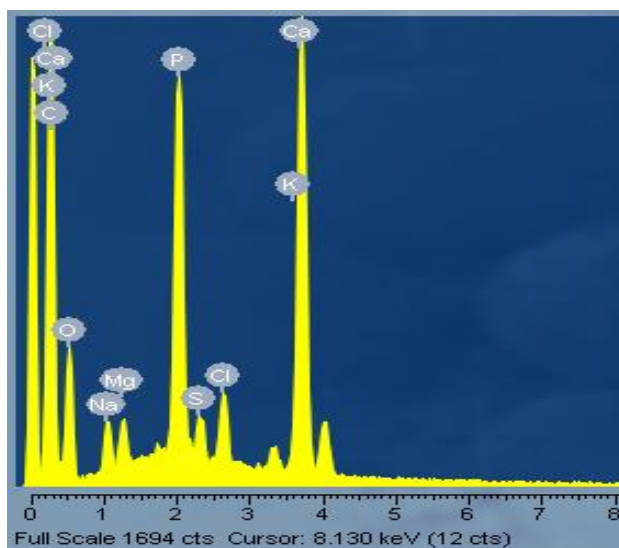


Рисунок 7. Энергодисперсионный спектр кристалла

Характеристика групп обследованных пациентов

Характеристика группы пациентов с остеоартрозом

В группу пациентов с ОА было включено 110 человек. Средний возраст больных составил $58,9 \pm 7,14$ (Ме 60) лет. В исследовании приняло участие 70 женщин (63,6%) и 40 мужчин (36,4%), отношение гендерных долей (женщин и мужчин) составило 1,8:1.

Изучая анамнез заболевания, удалось выяснить, что средняя продолжительность заболевания у пациентов с ОА составила $12,2 \pm 5,57$ года (Ме 12 лет) лет. Оперативное лечение правого тазобедренного сустава произведено 66 пациентами (58,9%), левого – 46 (41,1%), отношение прооперированных правых и левых суставов составило 1,4:1. При этом рентгенологические стадии по Kellgren J.H. и Lawrence J.S. были распределены следующим образом (рисунок 8): II диагностирована у 4 пациентов (0,4%), III – у 64 человек (59,2%), IV стадию ОА имели 44 пациента (40,4%).

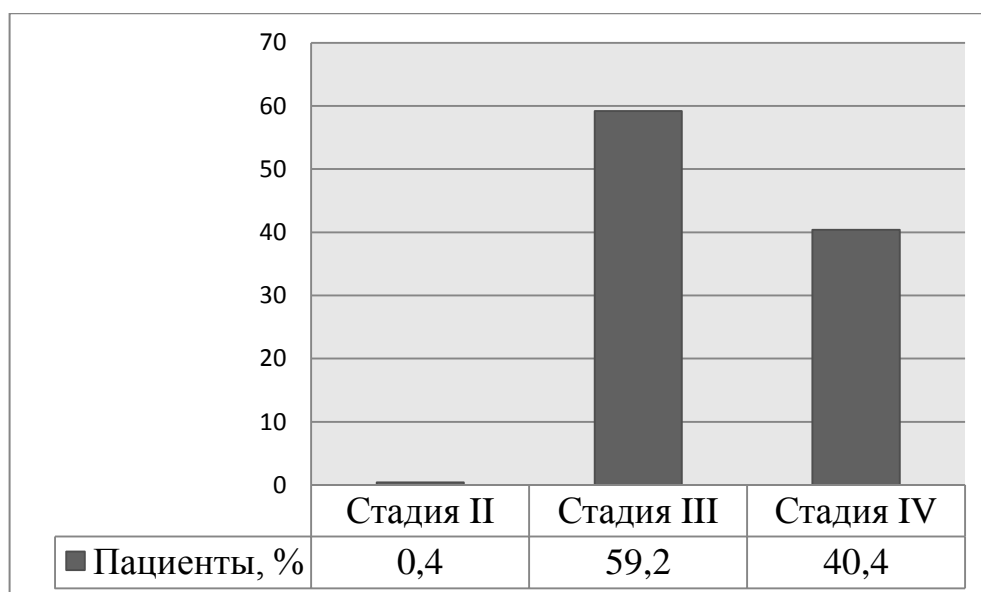


Рисунок 8. Распределение рентгенологических стадий в группе ОА

Антропометрические данные у пациентов с ОА продемонстрировали, что ИМТ в среднем по группе составил $28,8 \pm 6,12$ кг/м² (Ме 27,75 кг/м²). Уровень боли перед операцией по визуально-аналоговой шкале составил $77,65 \pm 16,72$ мм (Ме 75 мм). Индекс Харриса (HHS) в данной группе $50,7 \pm 0,56$ баллов (Ме 46 баллов). Уровень скорости клубочковой фильтрации (СКФ) по формуле Кокрофта-Голта составил $90,5 \pm 30,94$ мл/мин/1,73. Уровень общего белка и фибриногена у больных ОА перед оперативным лечением соответственно $74,6 \pm 7,04$ (Ме 73,5) г/л и $3,93 \pm 1,14$ (Ме 3,9) г/л.

Наличие контрактур оценивали во время осмотра пациентов, при этом чаще всего обнаруживали смешанные. В общей сложности контрактуры пораженного сустава имели 89 (79,5%) пациентов.

В таблице 1 продемонстрированы гендерные различия основных характеристик группы больных с ОА.

Таблица 1

Клинико-лабораторная характеристика группы больных с ОА

Характеристика	Женщины	Мужчины
----------------	---------	---------

Всего, абс. (%)	70 (64%)	40 (36%)
Возраст, годы	60,6±9,68 (Me 60)	55,8±9,47 (Me 59)
Анамнез, годы	10,8±8,63 (Me 9)	13,2±7,66 (Me 9)
Левый/правый тазобедренный сустав, абс.	24/48	22/18
Стадия Kellgren J.H. и Lawrence J.S.: II/III/IV, абс.	4/36/30	0/26/14
Уровень боли по ВАШ, мм	78,6±16,75 (Me 80)	76,5±16,97 (Me 75)
HHS, баллы	49,2±15,5 (Me 45)	53,3±21,07 (Me 57)

*Характеристика группы пациентов с асептическим некрозом головки
бедренной кости*

В группу пациентов с АНГБК включено 106 пациентов, средний возраст которых составил 57,1±10,23 (Me 58) лет. В исследовании приняло участие 64 женщин (60,4%) и 42 мужчин (39,6%) с АНГБК, соотношение гендерных долей (женщин и мужчин) составило 1,5.

Изучая анамнез заболевания, удалось выяснить, что продолжительность заболевания у пациентов с АНГБК в среднем составила 4,8±2,76 года (Me 4 лет) лет. Были выделены механизмы развития АНГБК, так ОА предшествовал АНГБК у 42 пациентов (39,6%), травма - у 12 (11,3%), без каких-либо предпосылок (идиопатический) АНГБК наблюдался у 52 (49,1%) участников исследования. Протезирование правого тазобедренного сустава было произведено 56 пациентами (52,8%), левого – 50 (47,2%), отношение протезированных правых и левых суставов составило 1,1:1. При этом рентгенологические стадии АНГБК были распределены следующим образом (рисунок 5.11): II диагностирована у 4 пациентов (0,4%), III – у 62 человек (58,5%), IV стадию ОА имели 42 пациента (41,1%) (рисунок 9).

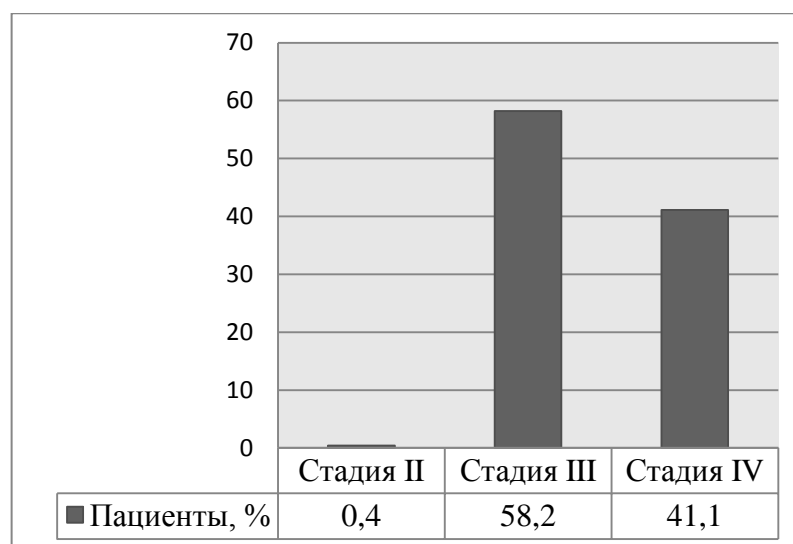


Рисунок 9. Распределение рентгенологических стадий в группе АНГБК.

Данные антропометрического обследования у пациентов с АНГБК продемонстрировали, что ИМТ в среднем по группе составил $29,9 \pm 10,59$ кг/м² (Me 9,29 кг/м²). Уровень боли по ВАШ составил $92,06 \pm 10,47$ мм (Me 95 мм). Индекс NHS в данной группе в среднем составил $68,4 \pm 12,65$ баллов (Me 71 балл). Уровень скорости клубочковой фильтрации (СКФ) по формуле Кокрофта-Голта составил $90,9 \pm 27,08$ мл/мин/1,73. Уровни общего белка и фибриногена в венозной крови у больных ОА перед эндопротезированием составили соответственно $74,5 \pm 7,18$ (Me 75,9) г/л и $3,13 \pm 0,74$ (Me 2,9) г/л.

Наличие контрактур оценивали во время осмотра, при этом чаще всего обнаруживали смешанные. В общей сложности контрактуры пораженного сустава имели 80 (75,5%) пациентов.

В таблице 2 продемонстрированы гендерные различия основных характеристик группы пациентов с АНГБК.

Таблица 2

Клинико-лабораторная характеристика группы пациентов с АНГБК

Характеристика	Женщины	Мужчины
Всего, абс. (%)	64 (60,4%)	42 (39,6%)
Возраст, годы	$57,8 \pm 9,38$ (Me 58,5)	$56,0 \pm 11,57$ (Me 56)

Анамнез, годы	6,5±3,72 (Me 6)	4,38±3,04 (Me 3)
Левый/правый тазобедренный сустав, абс.	24/40	26/18
Стадия: II/III/IV, абс.	2/38/24	0/32/10
Уровень боли по ВАШ, мм	90,7±12,35 (Me 95)	94,2±6,38 (Me 95)
HHS, баллы	65,7±14,84 (Me 69,5)	71,1±7,88 (Me 71)

Характеристика группы сравнения

Группу сравнения составили 50 пациентов, которым проводилось тотальное эндопротезирование тазобедренных суставов по поводу переломов проксимального отдела бедренной кости. Средний возраст пациентов в этой группе составил 57,04±19,78 (Me 60) лет. В исследовании приняло участие 22 женщины (44%) и 28 мужчины (56%), соотношение гендерных долей (мужчин и женщин) составило 1,3.

Протезирование правого тазобедренного сустава было произведено 14 пациентам (28%), левого – 36 (72%) (рисунок 10), отношение протезированных левых и правых тазобедренных суставов составило 1,3:1.

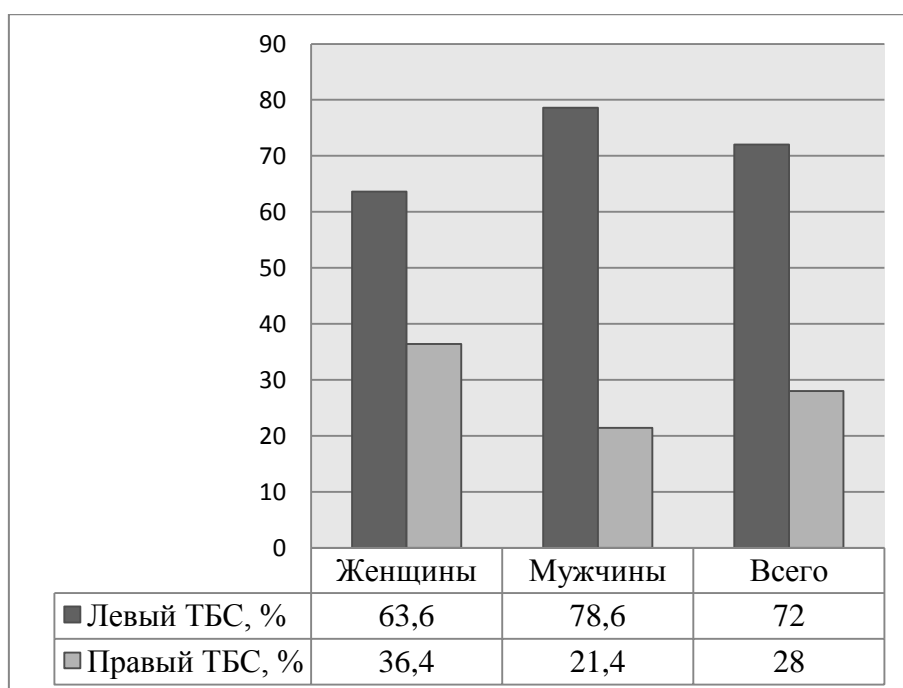


Рисунок 10. Распределение оперированных суставов в контрольной группе.

Антропометрические данные пациентов, включенных в группу сравнения продемонстрировали, что ИМТ в среднем составил $24,7 \pm 5,01$ кг/м² (Ме 24,02 кг/м²). Уровень боли по ВАШ составил $98,6 \pm 7,00$ мм (Ме 100 мм). Индекс NHS в данной группе в среднем показал $54,6 \pm 17,31$ баллов (Ме 54 балла). Уровень скорости клубочковой фильтрации, рассчитанный по формуле Кокрофта-Голта, составил $79,9 \pm 30,57$ мл/мин/1,73. Уровни общего белка и фибриногена в венозной крови у больных ОА перед эндопротезированием составили соответственно $72,4 \pm 6,32$ (Ме 70,35) г/л и $4,5 \pm 1,00$ (Ме 4,5) г/л.

В таблице 3 продемонстрированы гендерные различия основных характеристик данной группы пациентов.

Таблица 3

Клинико-лабораторная характеристика группы сравнения пациентов

Характеристика	Женщины	Мужчины
Всего, абс. (%)	22 (44%)	28 (56%)
Возраст, годы	$53,3 \pm 20,6$ (Ме 56)	$60,0 \pm 19,34$ (Ме 64)
Левый/правый тазобедренный сустав, абс.	14/8	22/6
Уровень боли по ВАШ, мм	$100 \pm 0,00$ (Ме 100)	$100 \pm 0,00$ (Ме 100)
NHS, баллы	$49,8 \pm 18,71$ (Ме 69,5)	$58,4 \pm 15,79$ (Ме 59)

Переходя к изложению результатов исследования диагностической значимости предлагаемых методов исследования, необходимо уточнить некоторые базовые понятия, определяющие диагностическую значимость методов исследования. К таким понятиям относятся:

1. Клиническая чувствительность;
2. Клиническая специфичность;
3. Отношение правдоподобия;
4. Прогностическая значимость положительного результата;
5. Прогностическая значимость отрицательного результата.

Диагностическая значимость использованных в работе методов идентификации кристаллов в суставном хряще при ОА и АНГБК оценивалась в соответствии с ГОСТ Р 53022-2008.

Согласно Правилам оценки клинической информативности лабораторных тестов (ГОСТ Р 53022.3-2008) клиническая чувствительность - это способность диагностического метода выявлять заболевание; отражает соотношение истинных заключений к общему числу окончательных заключений в данной группе пациентов. Другими словами, чувствительность отражает допустимость ошибок I рода.

Клиническая специфичность - это способность метода диагностики отвергать заболевание, констатировать его отсутствие там, где его действительно нет. Таким образом, специфичность отражает допустимость ошибок II рода.

Отношением правдоподобия для конкретного результата диагностического метода называется отношение вероятности данного результата у лиц с диагностируемым заболеванием к вероятности такого же результата у лиц без заболевания. Иначе отношение правдоподобия показывает, во сколько раз выше или ниже вероятность получить данный результат теста у больных, нежели здоровых.

Предсказательная ценность положительных или отрицательных результатов тестов указывает при их интерпретации на вероятность действительного наличия патологии при положительном результате или надёжность исключения патологии при отрицательном результате.

Предсказательная ценность (синоним: посттестовая вероятность болезни у пациента) результата диагностики зависит от распространённости

болезни в популяции, которую можно рассматривать как претестовую вероятность наличия болезни у пациента. Так, по данным Всемирной организации здравоохранения распространённость остеоартроза в общей популяции составляет 20% [Насонов Е.Л., 2011], а АНГБК не превышает 5% [Watt I. et al, 1983].

Диагностическая значимость методов рентгенструктурного анализа для обнаружения микрокристаллических депозитов в суставном хряще при остеоартрозе

Рентгеновская дифракция

При оценке чувствительности и специфичности рентгеновской дифракции обнаруживать кристаллы при ОА установлено, что при высокой статистической достоверности ($p < 0,0001$), очень хорошем качестве модели анализа ($AUC = 0,829$, $SE = 0,046$) чувствительность метода составляет 81,8%, специфичность – 84,0%. Результаты анализа в виде ROC-кривой представлены на рисунке 11. При этом прогностическая значимость положительного результата составила 56,104% (95% ДИ 45,93 до 67,62%), отрицательного – 94,755% (95% ДИ 90,84 до 97,34%).

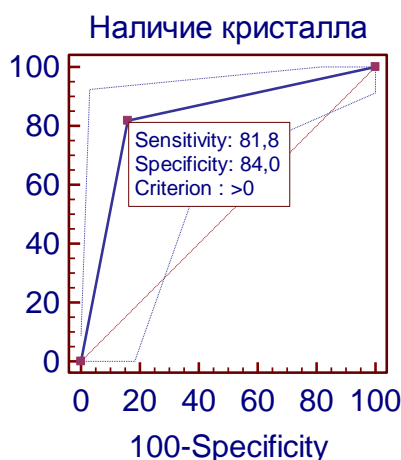


Рисунок 11. ROC-кривая оценки диагностической значимости рентгеновской дифракции в обнаружении кристаллов при ОА

Отношения правдоподобий в случаях положительного и отрицательного результатов для рентгеновской дифракции составляют более 10 и менее 0,1 соответственно, что позволяет судить о высокой достоверности окончательного диагностического решения рентгеновской дифракции при обнаружении кристаллов при ОА.

Таким образом, рентгеновская дифракция является высокочувствительным и специфичным методом диагностики микрокристаллических депозитов в суставном хряще у пациентов при ОА.

Электронно-зондовый анализ

Оценка общей чувствительности и специфичности электронно-зондового анализа для обнаружения микрокристаллов при ОА на модели очень хорошего качества ($AUC=0,809$, $SE=0,085$) показала, что при высокой статистической достоверности ($p<0,0001$) чувствительность метода составляет 76,4%, специфичность – 80,0%. Результаты анализа в виде ROC-кривой представлены на рисунке 12. Анализ значимости прогноза электронно-зондового исследования показал, что прогностическая достоверность положительного результата составляет 50,001% (95% ДИ 40,34 до 59,44%), отрицательного – 93,132% (95% ДИ 88,77 до 96,18%).

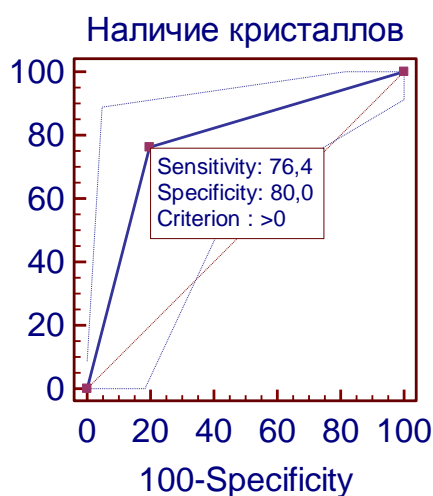


Рисунок 12. ROC-кривая общей оценки диагностической значимости электронно-зондового анализа в обнаружении кристаллов при ОА

Отношения правдоподобий в случаях положительной и отрицательной посттестовых вероятностей составляют более 10 и менее 0,1 соответственно, что говорит о высокой значимости окончательного диагностического решения при обнаружении кристаллов в суставном хряще у пациентов с ОА методами электронно-зондового анализа.

При проведении анализа с помощью РЭМ с ЭРС обнаруживали два типа импрегнации суставного хряща микрокристаллами: диффузный и очаговый. Поэтому были исследованы частные диагностические значимости РЭМ с ЭРС при обнаружении отдельных видов кальцификации.

Изучение диагностических характеристик электронно-зондового анализа для обнаружения очаговой кальцификации хряща при ОА на модели хорошего качества ($AUC=0,722$, $SE=0,047$) показало, что при высокой статистической достоверности ($p<0,0001$) чувствительность и специфичность РЭМ с ЭРС составляют соответственно 56,4 и 88,0%. Результаты в виде ROC-кривой представлены на рисунке 13.

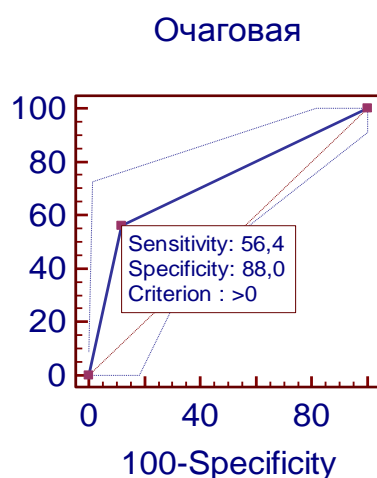


Рисунок 13. ROC-кривая оценки диагностической значимости обнаружения очагового типа кальцификации хряща при электронно-зондовом анализе у пациентов с ОА

Изучение значимости прогноза электронно-зондового исследования в данном случае показало, что прогностическая достоверность положительного результата составляет 54,02% (95% ДИ 30,67 до 76,15%), отрицательного – 88,979% (95% ДИ 79,92 до 94,91%).

Отношения правдоподобий в случаях положительного и отрицательного результатов составляют более 10 и менее 0,1 соответственно, что говорит о высокой достоверности окончательного диагностического решения электронно-зондового анализа при обнаружении кристаллов при ОА.

При анализе диагностических параметров электронно-зондового анализа для обнаружения диффузной кальцификации хряща при ОА не удалось получить должного качества модели ($AUC=0,528$, $SE=0,1$) в связи с чем дальнейшее проведение анализа было нецелесообразным.

Рассмотрена ценность отдельных типов кальцификации хряща для диагностики стадий ОА. Как показано в таблице 4, очаговая импрегнация кристаллами суставного хряща на ROC-модели хорошего качества ($AUC=0,754$, $SE=0,0548$, рисунок 14) с высокой достоверностью ($p=0,0049$) продемонстрировала высокую чувствительностью и специфичностью (60,6 и 70,2% соответственно) при диагностике II и III стадий ОА.

Таблица 4

Результаты ROC-анализа диагностической значимости отдельных типов кристаллизации хряща при II и III стадиях ОА

Тип кальцификации	AUC	SE	95% ДИ	Чувствительность	Специфичность	p
Очаговая	0,754	0,0548	0,647-0,861	60,6%	70,2%	0,004

Диффузная	0,541	0,0445	0,454-0,628	84,8%	23,4%	0,353
-----------	-------	--------	-------------	-------	-------	-------

При этом прогностическая достоверность положительного результата составила 43,704% (95% ДИ 44,85 до 53,49%), отрицательного – 87,695% (95% ДИ 82,2 до 91,99%).

Отношения правдоподобий в случае положительной посттестовой вероятности составляет 5, отрицательной посттестовой вероятности составляет менее 0,1, что позволяет судить о умеренно высокой значимости окончательного диагностического решения при обнаружении очагового типа кальцификации суставного хряща у пациентов с II и III стадиями ОА.

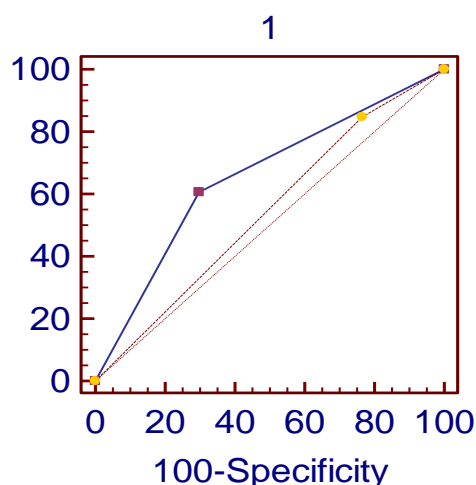


Рисунок 14. ROC-кривая оценки диагностической значимости обнаружения отдельных типов кальцификации хряща при электронно-зондовом анализе у пациентов с ОА при II и III стадиях заболевания

Примечание. Сплошной фиолетовой линией показана ROC-кривая для диффузной кальцификации; пунктирной оранжевой линией – очаговой.

Как видно из таблицы 4 и рисунка 14 диффузная кальцификация хряща при II и III стадиях ОА не продемонстрировала статистически значимых диагностических показателей.

Следовательно, при II и III рентгенологических стадиях ОА значимой диагностической чувствительностью и специфичностью обладает очаговый тип кальцификации.

Таблица 5 демонстрирует иную картину диагностической значимости отдельных видов кальцификации хряща при IV рентгенологической стадии ОА. Так, очаговая кальцификация не продемонстрировала должной модели и статистической значимости результатов ROC-анализа ($AUC=0,754$, $SE=0,0548$). В то время как диффузная кальцификация обладает высокими показателями чувствительности и специфичности (соответственно: 97,9%, 87,9%). При этом оценка модели анализа «очень хорошая» ($AUC=0,894$) с $p < 0,0001$, как показано на рисунке 15.

Таблица 5

Результаты ROC-анализа диагностической значимости отдельных типов кристаллизации хряща при IV стадии ОА

Тип кальцификации	AUC	SE	95% ДИ	Чувствительность	Специфичность	p
Диффузная	0,894	0,0426	0,810-0,977	97,9%	87,9%	0,0001
Очаговая	0,552	0,0634	0,427-0,676	50,0%	60,6%	0,4460

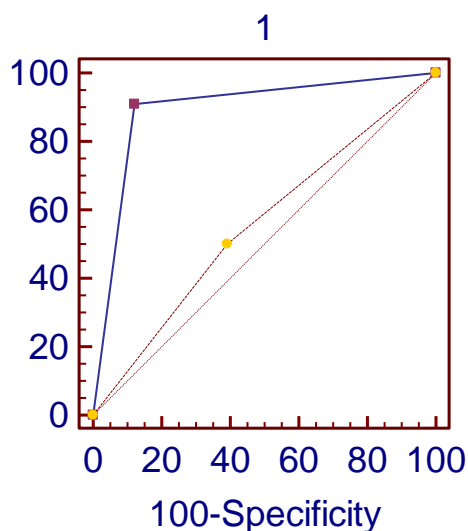


Рисунок 15. ROC-кривая оценки диагностической значимости обнаружения отдельных типов кальцификации хряща при электронно-зондовом анализе у пациентов с ОА при II и III стадиях заболевания

Примечание. Сплошной фиолетовой линией показана ROC-кривая для диффузной кальцификации; пунктирной оранжевой линией – очаговой.

Нужно отметить, что прогностическая достоверность положительного и отрицательного результатов составила соответственно 65,255% (95% ДИ 54,01 до 75,38%), отрицательного – 97,477% (95% ДИ 94,4 до 99,13%).

Изучение отношения правдоподобий в случаях положительного и отрицательного результатов для диффузной микрокристаллической импрегнации суставного хряща при IV рентгенологической стадии ОА составляют более 10 и менее 0,1 соответственно, что говорит о высокой достоверности окончательного диагностического решения электронно-зондового анализа при обнаружении кристаллов при ОА.

Проведённый анализ свидетельствует о том, что электронно-зондовый анализ является высокочувствительным и специфичным методом диагностики микрокристаллических депозитов в суставном хряще у пациентов с ОА. Выявляемые особенности кальцификации хряща имеют высокое диагностическое значение для диагностики отдельных стадий

кальцификации. Так, для II и III стадий ОА умеренно-высокую диагностическую значимость имеет очаговый тип импрегнации суставного хряща микрокристаллами; для IV стадии очень высокую степень правдоподобия имеет диффузный тип кальцификации.

Диагностическая значимость методов рентгенструктурного анализа для обнаружения микрокристаллических депозитов в суставном хряще при асептическом некрозе головки бедренной кости

Рентгеновская дифракция

Проведён анализ диагностической значимости рентгенструктурного анализа для диагностики микрокристаллических отложений в суставном хряще у больных АНГБК. При оценке чувствительности и специфичности рентгеновской дифракции обнаруживать кристаллы в суставном хряще при АНГБК установлено, что при высокой статистической достоверности ($p < 0,0001$), превосходном качестве модели анализа ($AUC = 0,902$, $SE = 0,042$) чувствительность метода составляет 93,3%, а специфичность – 95,7%. Результаты анализа в виде ROC-кривой представлены на рисунке 16. Прогностическая значимость положительного результата составила 53,314% (95% ДИ 32,89 до 72,96%), отрицательного – 99,633% (95% ДИ 97,97 до 99,99%).

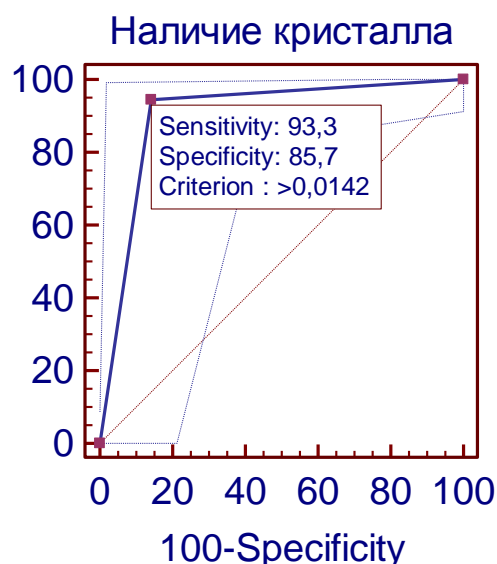


Рисунок 16. ROC-кривая оценки диагностической значимости рентгеновской дифракции в обнаружении кристаллов при АНГБК

Отношения правдоподобий в случаях положительного и отрицательного результатов для рентгеновской дифракции при АНГБК составляют более 10 и менее 0,1 соответственно, что позволяет судить о высокой достоверности окончательного диагностического решения рентгеновской дифракции при обнаружении кристаллов при АНГБК.

Результаты проведённого анализа свидетельствуют о том, что рентгеновская дифракция является высокочувствительным и специфичным методом диагностики микрокристаллических депозитов в суставном хряще у пациентов с АНГБК.

Электронно-зондовый анализ

Оценка общей чувствительности и специфичности электронно-зондового анализа для обнаружения микрокристаллов в суставном хряще при АНГБК на модели очень хорошего качества ($AUC=0,878$, $SE=0,046$) продемонстрировала, что при высокой статистической достоверности

($p < 0,0001$) чувствительность метода составляет 94,7%, специфичность – 81,0%. Результаты анализа в виде ROC-кривой представлены на рисунке 17.

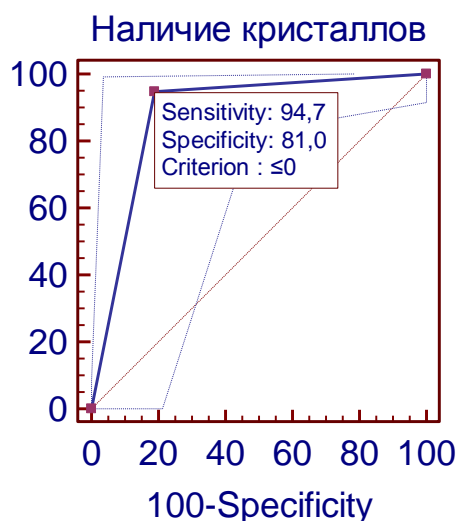


Рисунок 17. ROC-кривая общей оценки диагностической значимости электронно-зондового анализа в обнаружении кристаллов при АНГБК

Анализ значимости прогноза электронно-зондового исследования показал, что прогностическая достоверность положительного результата составляет 40,781% (95% ДИ 37,8 до 54,02 %), отрицательного – 99,657% (95% ДИ 99,32 до 99,85%).

Отношение правдоподобий в случаях положительного результата составила 4,6 и отрицательного менее 0,1. На основании этих данных можно утверждать об умеренной достоверности окончательного диагностического решения электронно-зондового анализа в случае положительного результата и высокой в случае исключения диагноза АНГБК. Другими словами, электронно-зондовый анализ с высокой степенью достоверности позволяет отвергнуть диагноз и со сравнительно небольшой степенью подтвердить.

Таким образом, анализ РЭМ с ЭРС является в достаточной степени чувствительным и специфичным методом диагностики микрокристаллических депозитов в суставном хряще у пациентов с АНГБК.

При проведении анализа суставного хряща при АНГБК с помощью электронно-зондового анализа также обнаруживали два типа импрегнации суставного хряща микрокристаллами: диффузный и очаговый. Поэтому были исследованы частные диагностические значимости РЭМ с ЭРС при обнаружении отдельных видов кальцификации.

Изучение диагностических характеристик электронно-зондового анализа для обнаружения очаговой кальцификации хряща при АНГБК на модели неудовлетворительного качества ($AUC=0,560$, $SE=0,049$) при отсутствии статистической достоверности ($p=0,219$) чувствительность и специфичность электронно-зондового анализа составляют соответственно 68,4 и 85,2%. Данные показатели не удовлетворяют необходимому критическому уровню значимости для диагностических методов исследования. Результаты анализа представлены в виде таблицы 7 и на ROC-кривой на рисунке 18.

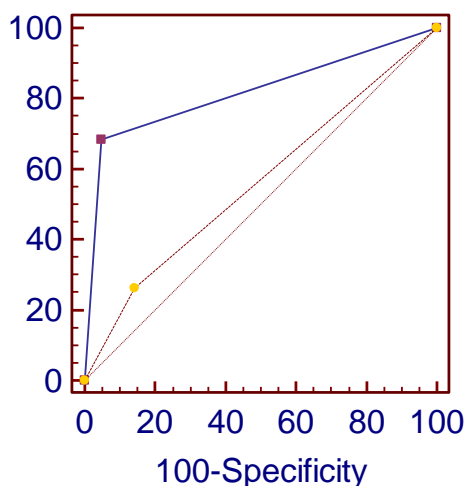


Рисунок 18. ROC-кривая оценки диагностической значимости обнаружения отдельных типов кальцификации хряща при электронно-зондовом анализе у пациентов с АНГБК

Примечание. Сплошной фиолетовой линией показана ROC-кривая для диффузной кальцификации; пунктирной оранжевой линией – очаговой.

Таблица 6

Результаты ROC-анализа диагностической значимости отдельных типов
кристаллизации хряща при АНГБК

Тип кальцификации	AUC	SE	95% ДИ	Чувствительность	Специфичность	p
Диффузная	0,818	0,0391	0,742-0,895	68,4%	95,2%	0,0001
Очаговая	0,560	0,0490	0,464-0,656	26,3%	85,7%	0,2192

Из таблицы 6 видно, что условие очень хорошей диагностической модели соблюдается в случае диффузного типа кальцификации суставного хряща при АНГБК (AUC=0,818, SE=0,039) при $p < 0,0001$. При этих условиях диагностическая чувствительность диффузного типа кальцификации хряща при АНГБК составляет 68,4%, специфичность – 95,2%.

Изучение значимости прогноза в данном случае показал прогностическую достоверность положительного результата равную 42,42% (95% ДИ 22,7 до 44,1 %), прогностическую значимость отрицательного результата – 98,37% (95% ДИ 96,1 до 99,5%).

Таким образом, из полученных данных вытекает, что отношение правдоподобий в случаях положительного результата составило более 5, а отрицательного - менее 0,1. На основании этих данных можно говорить об умеренной достоверности окончательного диагностического решения электронно-зондового анализа в случае положительного результата и высокой - в случае исключения диагноза АНГБК.

Можно заключить, что диффузный тип кальцификации суставного хряща является патогномоничным признаком при АНГБК, чего нельзя сказать об очаговом типе.

Были изучены значения отдельных типов кальцификации хряща для диагностики рентгенологических стадий АНГБК. Так, анализ диагностической роли очаговой инкрустации хряща при II и III стадиях заболевания продемонстрировал низкую статистическую значимость

($p=0,0637$) и неудовлетворительное качество диагностической модели ($AUC=0,589$, $SE=0,480$, рисунок 19). Что не позволяет считать данный вид кальцификации диагностически значимым при АНГБК.

Таблица 7

Результаты ROC-анализа диагностической значимости отдельных типов кристаллизации хряща при II и III стадиях АНГБК

Тип кальцификации	AUC	SE	95% ДИ	Чувствительность	Специфичность	p
Диффузная	0,655	0,0545	0,548-0,762	67,6%	63,4%	0,0045
Очаговая	0,589	0,0480	0,495-0,683	32,4%	85,4%	0,0637

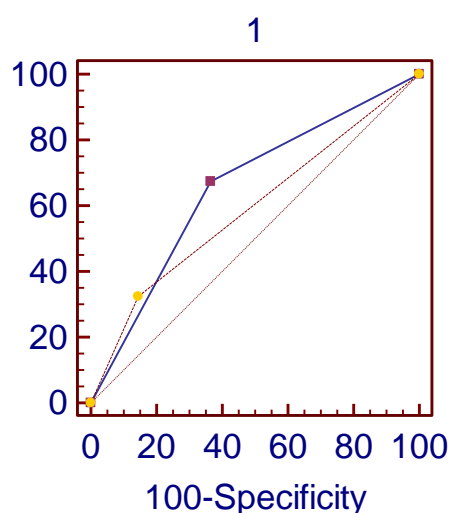


Рисунок 19. ROC-кривая оценки диагностической значимости обнаружения отдельных типов кальцификации хряща при электронно-зондовом анализе у пациентов с АНГБК при II и III стадиях заболевания. Примечание. Сплошной фиолетовой линией показан ROC-кривая для диффузной кальцификации; пунктирной оранжевой линией – очаговой.

Из таблицы 7 следует, что диффузная кальцификация, как диагностический параметр продемонстрировала достаточную чувствительность и специфичность (67,6%, 63,4% соответственно) на модели удовлетворительного качества ($AUC=0,655$, $SE=0,545$, $p=0,0045$).

Это позволяет судить о значимости прогноза, который показал прогностическую достоверность положительного результата равную 17,65% (95% ДИ 11,3 до 25,67 %), прогностическую значимость отрицательного результата – 95,1% (95% ДИ 90,85 до 97,76%).

Отношение правдоподобий в случаях положительного результата составила 4 и отрицательного менее 0,1. На основании этих данных можно утверждать о невысокой достоверности окончательного диагностического решения электронно-зондового анализа в случае положительного результата и высокой в случае исключения диагноза АНГБК. Говоря иначе, диффузная кальцификации со сравнительно небольшой степенью позволяет подтвердить диагноз и с высокой степенью достоверности - отвергнуть.

Изучение диагностической значимости очагового типа инкрустации суставного хряща при IV стадии АНГБК продемонстрировало низкую статистическую значимость ($p=0,2192$) и неудовлетворительное качество диагностической модели ($AUC=0,527$, $SE=0,0574$, рисунок 20). Что не позволяет считать данный вид кальцификации диагностически значимым при IV стадии АНГБК.

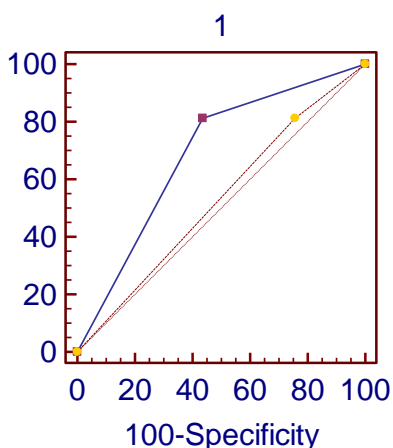


Рисунок 20. ROC-кривая оценки диагностической значимости обнаружения отдельных типов кальцификации хряща при электронно-зондовом анализе у пациентов с АНГБК при IV стадии заболевания

Примечание. Сплошной фиолетовой линией показана ROC-кривая для диффузной кальцификации; пунктирной оранжевой линией – очаговой.

Таблица 8

Результаты ROC-анализа диагностической значимости отдельных типов кристаллизации хряща при II и III стадиях АНГБК

Тип кальцификации	AUC	SE	95% ДИ	Чувствительность	Специфичность	p
Диффузная	0,689	0,0596	0,572-0,805	81,2%	56,5%	0,0015
Очаговая	0,527	0,0574	0,415-0,640	26,3%	65,7%	0,2192

Наоборот, диффузный тип кальцификации хряща продемонстрировал высокую чувствительность (81,2%) и специфичность (56,5%) на модели удовлетворительного качества (AUC=0,689, SE=0,0596) с высокой статистической значимостью $p=0,0015$. При этих показателях прогностическая достоверность положительного результата составила 18,556% (95% ДИ 12,57 до 25,88 %), отрицательного результата – 97,92% (95% ДИ 94,24 до 99,53%).

Отношение правдоподобий в случаях положительного результата составило 5 и отрицательного - менее 0,1. На основании этих данных можно утверждать об умеренной достоверности окончательного диагностического решения электронно-зондового анализа в случае положительного результата и высокой - в случае исключения диагноза АНГБК.

Изучение диагностической ценности методов рентгенструктурного анализа продемонстрировало высокую значимость этих методов в диагностике микрокристаллических депозитов суставного хряща при ОА и АНГБК. С помощью предлагаемых методов была изучена ценность отдельных типов кальцификации хряща в диагностике ОА и АНГБК.

Рисунок 21 иллюстрирует сравнительную характеристику диагностической ценности рентгеновской дифракции и электронно-

зондового исследования в обнаружении микрокристаллических депозитов в суставном хряще при ОА и АНГБК.

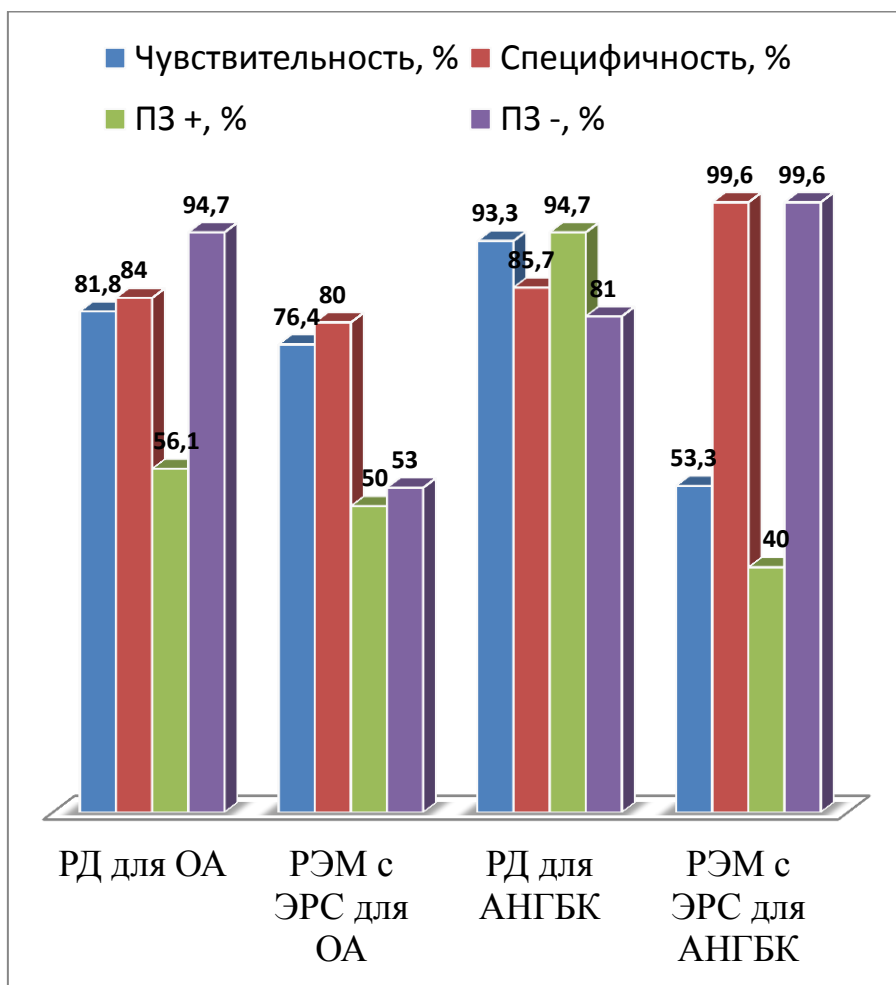


Рисунок 21. Характеристика методов рентгенструктурного анализа

Примечание: РД – рентгеновская дифракция. ПЗ – прогностическая значимость: «+» положительных и «-» отрицательных результатов.

Таким образом, предлагаемые методы рентгеновского структурного анализа могут быть рекомендованы для использования в научно-исследовательских и практических целях.

Информация о профильных публикациях

1. **Кабалык М.А.** Методы обнаружения кристаллов в суставном хряще: Status praesens. Часть 1 / Дубиков А.И., Петрикеева Т.Ю. // **Научно-практическая ревматология.** – 2012. – Т.52, №3. – С. 87-91.

2. **Кабалык М.А.** Методы обнаружения кристаллов в суставном хряще: Status praesens. Часть 2 / Дубиков А.И., Петрикеева Т.Ю. // **Научно-практическая ревматология.** – 2012. – Т.53, №4. – С. 88-90.

3. Феномен микрокристаллизации хряща при коксартрозе и асептическом некрозе головки бедренной кости / Дубиков А.И., **Кабалык М.А.**, Петрикеева Т.Ю., Кузьмин И.И., Корабцов А.А // **Научно-практическая ревматология.** – 2012. – Т.54, №5. – С. 37-41.

4. Дубиков А.И. Патогенетическое значение микрокристаллизации суставного хряща при остеоартрозе / **Кабалык М.А.**, Петрикеева Т.Ю. // **Научно-практическая ревматология.** – 2013. – Т.51. – С. 50-51.

Kabalyk M. Phenomenon of cartilage micro-crystallization in hip osteoarthritis and avascular necrosis of the femoral head / Dubikov A., Petrikeeva T., Korabtsov A., Kuzmin I. // European Journal of Internal Medicine. – 2013. – Vol. 24. – p. 117.

5. **Кабалык М.А.**, Дубиков А.И., Петрикеева Т.Ю. Способ обнаружения микрокристаллов в суставном хряще и других биологических тканях // Патент РФ №2510504, Официальный бюллетень федеральной службы по интеллектуальной собственности «Изобретения. Полезные модели», 2014, №9.

6. **Кабалык М.А.** Феномен микрокристаллического стресса при остеоартрозе / Дубиков А.И., Петрикеева Т.Ю., Карабцов А.А., Кузьмин И.И., Череповский А.В. // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2014. -№1. – С. 70-74.

7. **Кабалык М.А.** Микрокристаллизация суставного хряща при коксартрозе / Дубиков А.И., Петрикеева Т.Ю. // Материалы VII Национального конгресса терапевтов. М, 2012 – С. 87-88.

8. **Кабалык М.А.** Микрокристаллические депозиты в суставном хряще при асептическом некрозе головки бедренной кости – новый фактор патогенеза / Дубиков А.И., Петрикеева Т.Ю. // Актуальные проблемы экспериментальной, профилактической и клинической медицины: тез. докл. XIII тихоок. научно-практ. конф. студентов и молодых учёных с междун. участием, Владивосток, 2012. – С.234.

9. Петрикеева Т.Ю. Остеоартроз – микрокристаллическая артропатий или дегенеративно-воспалительный процесс? / **Кабалык М.А.**, Дубиков А.И. // Актуальные проблемы экспериментальной, профилактической и клинической медицины: тез. докл. XIII тихоок. научно-практ. конф. студентов и молодых учёных с междун. участием, Владивосток, 2012. – С.98.

10. Топильская О.О. Оценка суставного синдрома у пациентов с дегенеративными заболеваниями суставов в общеврачебной практике / **Кабалык М.А.**, Петрикеева Т.Ю., Киняйтна Е.В. // Актуальные проблемы экспериментальной, профилактической и клинической медицины: тез. докл. XIII тихоок. научно-практ. конф. студентов и молодых учёных с междун. участием, Владивосток, 2012. – С.105.

11. **Кабалык М.А.** Возрастные особенности микрокристаллической импрегнации суставного хряща при асептическом некрозе головки бедренной кости / Дубиков А.И., Петрикеева Т.Ю. // Актуальные проблемы экспериментальной, профилактической и клинической медицины: тез. докл. XIV тихоок. научно-практ. конф. студентов и молодых учёных с междун. участием, Владивосток, 2013. – С.123-124.

12. Петрикеева Т.Ю. Диагностическая значимость методов рентгеноструктурного анализа для обнаружения суставных кристаллических депозитов при остеоартрозе / **Кабалык М.А.**, Дубиков А.И. // Актуальные проблемы экспериментальной, профилактической и клинической медицины: тез. докл. XIV тихоок. научно-практ. конф. студентов и молодых учёных с междун. участием, Владивосток, 2013. – С.126-127.