

КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА**ГАСТРОЭНТЕРОЛОГИЯ**

DOI - 10.32743/UniMed.2022.86.3.13254

**АУТОИММУННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ ПРИРОДА НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО
ЯЗВЕННОГО КОЛИТА: ВОЗМОЖНОСТИ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ
МЕТОДОМ МОНОХРОМНОГО АНАЛИЗА НАНОЧАСТИЦ ПО СЛЮНЕ****Чой Ен Джун***д-р мед. наук, профессор ММУ, онколог, педиатр,
главный врач Центра европейской и восточной медицины,**РФ, г. Москва**E-mail: drchoiworld@gmail.com***AUTOIMMUNE-INFLAMMATORY NATURE OF ULCERATIVE COLITIS:
POSSIBILITIES OF NONINVASIVE DIAGNOSIS BY MONOCHROME ANALYSIS
OF NANOPARTICLES BY SALIVA****Choi E.G.***Professor of MMU, oncologist, pediatrician,
Chief Physician of the Center for European and Oriental Medicine,
Russia, Moscow***АННОТАЦИЯ**

Одной из основных проблем современного здравоохранения являются хронические аутоиммунно-воспалительные заболевания кишечника, среди которых неспецифический язвенный колит отличается разнообразием клинической симптоматики, наличием внекишечных проявлений болезни и развитием тяжелых осложнений, что существенно затрудняет его выявление и определяет актуальность его раннего выявления и дифференциальной диагностики. Целью настоящей работы явилось изучение возможностей неинвазивной диагностики неспецифического язвенного колита по слюне методом монохромного анализа наночастиц. Для этого необходимо решить ряд задач: разработать диагностический алгоритм монохромного анализа наночастиц для определения выраженности и патофизиологической направленности гомеостатических сдвигов у больных с верифицированным диагнозом по образцам ротоглоточных смывов (слюны), а также рассчитать показатели диагностической специфичности и чувствительности теста. Исследования проводились в «Центре европейской и восточной медицины» с 2019 по 2021 год, и были обследованы 28 пациентов с верифицированным диагнозом неспецифического язвенного колита. Установлено, что наиболее типичные спектры слюны больных с неспецифическим язвенным колитом характеризовались четырёхмодальностью и преимущественностью рассеяния света на частицах малого диаметра 5,0 нм и 12,2 нм при соответственном вкладе в светорассеяние 19% и 31% (суммарно – 50%), вклад наночастиц среднего диаметра 107,8 нм составлял 23%, крупных частиц размером более 1000 нм – 27%, что являлось статистически достоверным ($p < 0,001$) при проведении сравнительного анализа со спектрами слюны практически здоровых лиц и пациентов с общесоматическими заболеваниями тех же локализаций. Показатели диагностической чувствительности в отношении неспецифического язвенного колита составили 90%, диагностической специфичности – 94%. Выводы: применение лазерной спектроскопии слюны является обоснованным для ранней неинвазивной диагностики неспецифического язвенного колита, когда со своевременно выставленным диагнозом лечебные мероприятия будут являться максимально эффективными и направленными на профилактику осложнений и системных проявлений заболевания.

ABSTRACT

One of the main problems of modern healthcare is chronic autoimmune inflammatory bowel diseases, among which ulcerative colitis is characterized by a variety of clinical symptoms, the presence of extra-intestinal manifestations of the disease and the development of severe complications, which significantly complicates its detection and determines the relevance of its early detection and differential diagnosis. The purpose of this work was to study the possibilities of non-invasive diagnosis of ulcerative colitis by saliva by the method of monochrome analysis of nanoparticles. To do this,

it is necessary to solve a number of tasks: to develop a diagnostic algorithm for monochrome analysis of nanoparticles to determine the severity and pathophysiological orientation of homeostatic shifts in patients with a verified diagnosis using samples of oropharyngeal flushes (saliva), as well as to calculate the diagnostic specificity and sensitivity of the test. The studies were conducted at the Center for European and Oriental Medicine from 2019 to 2021, and 28 patients with a verified diagnosis of ulcerative colitis were examined. It was found that the most typical saliva spectra of patients with nonspecific ulcerative colitis were characterized by four-modality and predominance of light scattering on particles of small diameter 5.0 nm and 12.2 nm with a corresponding contribution to light scattering of 19% and 31% (total – 50%), the contribution of nanoparticles of medium diameter 107.8 nm was 23%, large particles larger than 1000 nm – 27%, which was statistically significant ($p < 0.001$) when conducting a comparative analysis with the spectra of saliva practically healthy individuals and patients with general somatic diseases of the same localization. The indicators of diagnostic sensitivity for nonspecific ulcerative colitis were 90%, diagnostic specificity – 94%. Conclusions: the use of laser spectroscopy of saliva is justified for the early non-invasive diagnosis of ulcerative colitis, when with a timely diagnosis, therapeutic measures will be as effective as possible and aimed at preventing complications and systemic manifestations of the disease.

Ключевые слова: неспецифический язвенный колит, аутоиммунные заболевания, слюна, лазерная спектроскопия, монохромный анализ наночастиц.

Keywords: nonspecific ulcerative colitis, autoimmune diseases, saliva, laser spectroscopy, monochrome analysis of nanoparticles.

Введение

Одной из основных проблем современного здравоохранения являются хронические воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), рост частоты которых отмечается во всём мире [1]. Среди известных ВЗК неспецифический язвенный колит (НЯК) отличается разнообразием клинической симптоматики, наличием внекишечных проявлений болезни и развитием тяжелых осложнений, что существенно затрудняет его выявление и определяет актуальность отдельных вопросов дифференциальной диагностики ВЗК и НЯК [2]. По литературным данным заболеваемость НЯК в России составляет 2 случая на 100 тыс., а распространенность – 23 на 100 тыс. населения [3]. На данный момент этиология НЯК неизвестна, не в полной мере изучен патогенез заболевания, в связи с чем в последние годы активно проводится поиск новых неинвазивных маркеров НЯК, с помощью которых можно было бы диагностировать заболевание, определить тяжесть его течения и оценить эффективность проводимого лечения [4]. Большинство из применяемых методов диагностики НЯК являются инвазивными, дорогостоящими и неприемлемыми для широкого использования, поэтому разработка скрининг-теста для диагностики НЯК является приоритетным направлением современной гастроэнтерологии [5].

НЯК определяется как хроническое рецидивирующее аутоиммунное воспалительное заболевание слизистой оболочки толстого кишечника, реализующееся в результате воздействия сочетанных генетических и окружающих факторов [6]. Под аутоиммунным компонентом в патогенезе НЯК понимают патологические процессы, в основе которых лежит стойкий и продолжительный иммунный ответ на собственные тканевые аутоантигены (АГ), что приводит к повреждению клеток [7]. В организме практически здорового человека присутствуют естественные аутоантитела (АТ) класса иммуноглобулинов М, которые не являются причиной аутоиммунных заболеваний (АЗ), для запуска которых необходимо

как увеличение количества АТ, так и повышение антигенной специфичности [8]. Аутоиммунный механизм развития НЯК и других подобных ему заболеваний во многом определяются локализацией АГ в организме: если он содержится только в определенном органе, поражение носит локальный характер, затрагивая соответствующий орган; при широкой распространенности АГ в организме развивается так называемый «системный» процесс, развитие которого зависит от характера иммунного ответа организма: клеточная реакция (формирование цитотоксических Т-лимфоцитов) или гуморальная (выработка С-3 фракции комплемента с последующим образованием циркулирующих иммунных комплексов) [9].

В связи с тем, что удалить из организма АГ не представляется возможным аутоиммунные процессы протекают длительно. АТ, вырабатываемые при аутоиммунных реакциях, могут являться как органоспецифичными, так направленными против АГ клеток и их внутриклеточных органелл и молекул [10]. При развитии АЗ происходит сбой иммунологической толерантности в условиях аномально высокой антигенной стимуляции и/или нарушение механизмов саморегуляции иммунной системы (ИС) вследствие произошедших в ней первичных изменений [11]. Деструкция клеток и тканей, происходящая при АЗ, имеет сходство с адаптивным иммунитетом, и обусловлена специфическими иммуноглобулинами и субпопуляциями Т-клеток [12]. В случае органических поражений важную роль играют гиперчувствительность второго типа и клеточные реакции, а при органонеспецифических процессах – отложение циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), обеспечивающих асептические воспалительные реакции [13]. АИЗ могут реализоваться у больного при сочетании генетической предрасположенности и неблагоприятно воздействующих на организм условий окружающей среды [14]. Практически все изученные АИЗ ассоциированы с тем или иным генотипом системы тканевой совместимости человека Human Leukocyte Antigens (HLA) [15]. При органоспецифических аутоиммунных заболеваниях часто

встречаются гаплотипы B8-DR3, DR5, DR4, что подтверждает гипотезу об участии нескольких генетических факторов в развитии АИЗ, а именно: генов, определяющих общую предрасположенность к аутоиммунной патологии, и имеющих конкретную мишень для развития аутоиммунного состояния [16]. Имеется большое количество наблюдений, указывающих на то, что в пределах одной семьи выявлялись различные нозологические виды АИЗ, что может говорить о том, что наследственно передаётся лишь предрасположенность к аутоиммунизации, а не само заболевание [17].

В связи с повсеместным увеличением инфекционной заболеваемости роль вирусов и бактерий как пускового (триггерного) механизма развития АИЗ является превалирующей [18]. Инфекционные АГ могут провоцировать развитие аутоиммунного состояния двумя путями: во-первых, посредством так называемой «молекулярной мимикрии», и, во-вторых, через избыточную активацию аутореактивных лимфоцитов, которые не подвергаются «клональной экспансии» [19]. В ответ Т-хелперы передают антигенную информацию В-клеткам, которые синтезируют АТ [20]. Третий возможный вариант развития АИЗ может быть реализован активацией синтеза γ -интерферона при распознавании Т-лимфоцитами вирус-инфицированных клеток, который в свою очередь индуцирует экспрессию молекул HLA [21]. Триггерным механизмом развития АИЗ и НЯК, в частности, могут служить связанные с белками крови медикаменты, некроз тканей (изменение их антигенной структуры), нарушение целостности гистогематических барьеров, а также состояние «патологически усиленного иммунитета», обусловленного снижением активности клеток-супрессоров [22]. Вырабатываемые АТ по природе своей являются иммуноглобулинами классов G, A, M, роль которых изучена недостаточно, а частота встречаемости может коррелировать с возрастом, наличием инфекционных и онкологических заболеваний, воспалительных процессов, при интоксикациях и на фоне проведения медикаментозной терапии [23]. Хорошие показатели диагностической чувствительности и специфичности дают возможность рассматривать АТ в качестве лабораторных маркеров АИЗ: высокие титры АТ указывают на специфичность и значительную выраженность иммунного ответа [24].

Принципы диагностики АИЗ и НЯК в частности основаны на комплексном проведении лабораторных тестов: направленных на выявление специфических АТ; позволяющих установить сенсибилизацию Т-лимфоцитов к АГ; выявляющих ЦИК и лимфоцитарную инфильтрацию пораженных тканей при проведении биопсии; иммунологическое исследование (иммунограмма) [25]. При клинико-лабораторной диагностике АИЗ необходимо исследовать весь спектр антител, характерный для конкретного заболевания, а при оценке результатов учитывать, что не всегда имеется корреляция между остротой воспалительного процесса и титрами АТ [26]. Правильная интерпретация данных исследований может указать на степень

тяжести аутоиммунного процесса и характер его течения [27].

В идеале лабораторный метод диагностики АИЗ, включая НЯК, должен позволять установить не один тип АТ как это происходит при применении большинства традиционных лабораторных тестов, а весь спектр АТ, направленных на разные АГ [28]. Таким методом может явиться монохромный анализатор наночастиц (МАН), который является усовершенствованной модификацией метода лазерно-корреляционной спектроскопии (ЛКС) [29], что обуславливает их широкое применение в приборах различных фирм для медицинских и биологических исследований [30]. По сравнению с другими методами медико-биологических исследований, метод МАН обладает рядом существенных преимуществ: широким диапазоном исследуемых фракций, возможностью одновременного анализа частиц разных гидродинамических диаметров (структурно-функциональный анализ молекулярных ингредиентов биологических жидкостей), учётом характера межмолекулярных взаимодействий отдельных ингредиентов, достаточностью минимального количества исследуемого биоматериала, простой процедурой подготовки образцов к анализу, высокой скоростью измерений изучаемого образца и получения качественной и количественной информации [31].

Лазерная спектроскопия, в целом, и МАН, в частности, основаны на методологии динамического светорассеяния (ДС). Для измерения таких спектров применяются методы оптического смешения на основе гетеродинамирования и исследования самобиеений частот рассеянного света [32].

Метод гетеродинамирования заключается в смешении опорного лазерного излучения и излучения, рассеянного на исследуемом образце, на чувствительном элементе фотоприемника [33]. В этом случае фототок пропорционален квадрату суммы опорного излучения и поля рассеянного излучения [34]. Сущность метода самобиеений состоит в том, что свет, рассеянный исследуемым участком образца, направляется на фотоприемник, на котором и возникают биения между различными частотными компонентами спектра падающего света [35]. При этом ток фотоприемника оказывается промодулированным по амплитуде частотами биений флуктуаций концентраций частиц под воздействием света, рассеянного на исследуемом образце от нуля до ширины спектра рассеяния [36]. Релаксация микроскопических флуктуаций концентрации частиц к равновесному состоянию описывается уравнением диффузии:

$$\frac{\partial N_p}{\partial t}(r, t) = -D \cdot \Delta N_p(r, t) \quad (1.1)$$

где N_p – концентрация частиц, Δ – оператор Лапласа и D – коэффициент диффузии, который является ключевым параметром для определения размеров исследуемых частиц.

Решением уравнения диффузии в одномерном случае является экспоненциальная функция с показателем степени, содержащим коэффициент диффузии частиц D . В случае рассеяния света на флуктуациях концентрации монодисперсных частиц, решением является корреляционная функция поля $g^{(1)}(\tau)$:

$$g^{(1)}(\tau) = \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (1.2)$$

где τ – время релаксации флуктуаций концентрации частиц, которое обратно пропорционально характерной ширине Γ спектра мощности света.

Спектр мощности рассеянного света в случае, когда частицы в растворе одного размера, представляет собой Лоренциан, максимум которого, расположен на частоте возбуждающего света. Ширина Лоренциана на полувысоте равна:

$$\Gamma = 2\pi(\Delta f)_{1/2} = Dq^2 \quad (1.3)$$

где D – коэффициент диффузии частиц, q – волновой вектор рассеяния света.

Метод ДС позволяет определять размеры частиц в моно- и полидисперсных растворах. При исследовании полидисперсных растворов, каковыми являются практически все биологические жидкости, крайне важно, кроме определения размеров белков, агрегатов и везикулярных частиц не нарушать их целостность и концентрацию и, для этого, необходимо проводить измерения в их естественной среде.

Обработка рассеянного света базируется на следующем алгоритме.

Спектр мощности рассеянного света, падающего на фотоприемник, представляет собой Лоренциан, и в случае непрерывных распределений частиц по размерам имеет следующий вид:

$$S(\omega) = \int_0^{\infty} \frac{1}{\pi} \frac{A(\Gamma)\Gamma d\Gamma}{(\omega)^2 + (\Gamma)^2} \quad (1.4)$$

где $A(\Gamma)$ – функция распределения интенсивности рассеяния частиц по характерным для них диффузионным уширениям.

Наибольший интерес представляет вариационный метод, так как именно он используется в работе для обработки результатов [37].

Биологические жидкости находятся в тонком равновесии, определяемом ионной силой раствора, значением pH и рядом других факторов [38]. Это обстоятельство исключает возможность изучения распределения размеров белков, липопротеинов и агрегатов объектов в биологических жидкостях всеми классическими методами (в том числе методами проточной цитометрии), так как эти методы требуют препарирования образцов, приводящего к изменению условий существования, входящих в них агрегатов [39]. Этому недостатка лишен метод МАН, который может применяться к исходному образцу

нативной биологической жидкости. Метод МАН способен также обнаруживать незначительные изменения исследуемого объекта при сравнении спектров света, рассеянного образцом до и после изменения условий. Информация об исследуемом объекте методом МАН максимально достоверна т.к. в процессе измерений состояние образца не меняется под действием внешних факторов (лазерного излучения, температуры, химических реагентов и т.д.).

При патологических процессах, происходящих в организме человека, в крови увеличивается количество циркулирующих нанокомплексов, в первую очередь, внеклеточных везикул, а их вид и состав различны в зависимости от вида патологии [40]. Впоследствии эти везикулы поступают во все органы и ткани организма. За работы по изучению везикулярного обмена информацией в организме в 2013 году была присуждена Нобелевская премия: «Нобелевская премия по физиологии и медицине (2013): везикулярный транспорт» [41].

Для проведения исследований необходимо получить раствор слюны. Это требование связано с тем, что исследование неразбавленных образцов слюны не отвечает важному теоретическому аспекту метода МАН, а именно принципу «однократного рассеяния света». Выбор концентрации раствора слюны был основан на влиянии на результат измерений нескольких факторов, а именно: высокая концентрация частиц малых размеров сказывается на детектируемых размерах, связанных с взаимодействием между молекулами белка; малая концентрация крупных частиц в объеме рассеяния влияет на низкочастотную область спектра мощности и, следовательно, дополнительного пика в распределении мощности по размерам; при большой концентрации крупных частиц измерениям может мешать двукратное и многократное рассеяние; при низкой концентрации частиц в растворе уровень полезного сигнала незначительно превышает уровень шумов [42].

Для устранения возможных погрешностей при измерениях был проведен ряд тестирований НБЖ с целью определения оптимальной концентрации раствора слюны для исследований. Были получены следующие результаты: при концентрациях раствора от 1% до 10% в Фурье-спектрах мощности рассеянного света наблюдаются шумы, по порядку величины сопоставимые с уровнем полезного сигнала; с увеличением концентрации раствора с 1% до 20% мощность рассеянного света линейно возрастает; при концентрации свыше 20% мощность рассеянного света выходит на постоянный уровень. Такая зависимость может быть связана с процессом многократного рассеяния света исследуемым объектом. Исходя из полученных данных выбран оптимальный диапазон концентраций от 10% до 20%.

Специфика исследования биологических жидкостей человека

В медицинской диагностике для установления заболелания и контроля за его течением исследуют различные биологические жидкости организма: кровь, слюну, ликвор, мочу. Все эти жидкости имеют сложный белковый состав. Наибольший интерес имеет

исследование слюны в виде ротоглоточных смывов по причине неинвазивности забора биоматериала у пациента.

Пациенту предлагают 30 мл физиологического раствора, в разовом стакане и просят тщательно (в течение 0,5-1 мин.) прополоскать полость рта и глотки и сплюнуть жидкость обратно в стакан. Из полученной взвеси микропипеткой объемом 1000 мкл отбирают 1 мл в стерильную одноразовую пробирку, закупоривают и центрифугируют при 2500 об/мин в течение 5 мин. 0,8 мл надосадочной жидкости осторожно (чтобы не задеть осадок) переносят в кювету спектрометра для исследования. Суть предлагаемого метода заключается в анализе рассеянного света, получаемого путем просвечивания лазером биологической жидкости человека. Лазерный луч фокусируется на образце. Белки, находящиеся в жидкости, рассеивают свет, который фиксируется детектором. По характеру изменения интенсивности рассеянного света во времени можно определить, какого размера наночастицы находятся в жидкости. Размеры детектируемых молекул зависит от наличия в организме исследуемого тех или иных заболеваний. Учитывая успешность применения метода ЛКС [43], в последние годы появилась возможность усовершенствования приборной базы и программного обеспечения, что легло в основу монохромного анализатора наночастиц (МАН).

Цель настоящей работы – изучить возможности неинвазивной диагностики неспецифического язвенного колита по слюне методом монохромного анализа наночастиц. Поставленная цель решается выполнением ряда задач: разработка диагностического алгоритма монохромного анализа наночастиц для определения выраженности и патофизиологической направленности гомеостатических сдвигов у больных с верифицированным диагнозом НЯК по образцам ротоглоточных смывов (слюны), а также расчёт показателей диагностической специфичности и чувствительности теста.

Материалы и методы

Состав установки МАН: спектрометр лазерный с длиной волны 633 нм; персональный компьютер с эксклюзивным программным обеспечением для приёма сигнала с аналого-цифрового преобразователя и последующей обработки результатов исследования; лабораторная посуда для подготовки образцов к исследованию [44].

Спектрометр МАН состоит из следующих узлов: оптический блок; кювета для исследования биологической жидкости; гелий-неоновый лазер (длина волны - 633 нм); фотоприёмник; аналого-цифровой преобразователь (АЦП); блок питания.

Оптический блок спектрометра состоит из оптических элементов, фокусирующих лазерный на кювете с исследуемым образцом биологической жидкости и собирающих рассеянный свет от кюветы с находящейся в ней исследуемой НБЖ на фотоприёмное устройство [45]. Оптический блок спектрометра выполняет фиксацию положения лазера,

фотоприёмного устройства и элементов формирующей оптики. Лазерный модуль состоит из гелий-неонового лазера и блока его питания. Фотоприёмное устройство (ФПУ) предназначено для регистрации рассеянного света от частиц исследуемого образца, преобразования его в электрический сигнал и усиления его для подачи на АЦП. Фотоприёмник обеспечивает высокую чувствительность преобразования падающего света лазера в электрический ток. АЦП представляет собой 14-разрядный преобразователь входного напряжения в диапазоне от 0 до 3 вольт в полосе частот от 0 до 10 МГц. Подача оцифрованного сигнала на компьютер осуществляется через USB-порт. Блок питания спектрометра предназначен для получения стабильного напряжения, необходимого для питания электронных устройств прибора из напряжения 220 В с частотой 50 Гц.

Принципиальная оптическая схема спектрометра МАН приведена на рис. 1.

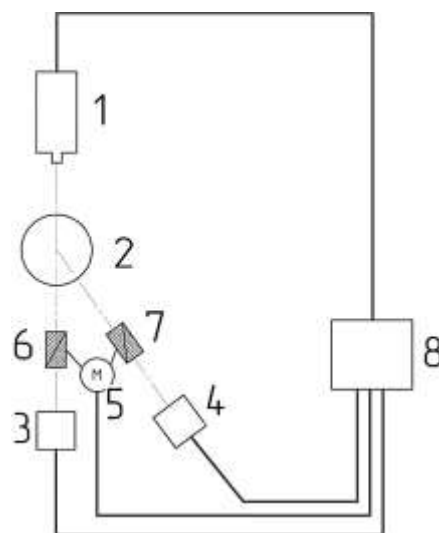


Рисунок 1. Блок-схема монохроматического анализатора наночастиц

где: 1 – лазер; 2 – кювета; 3, 4 – фотоприёмные устройства; 5 – поворотный блок; 6, 7 – поляризаторы; 8 – электронный блок.

Исходя из того, что объектом исследований являются жидкости, в т.ч. биологические, которые содержат в своём составе наночастицы белков, длина волны излучения устанавливалась исходя из спектров поглощения белков, воды, и крайних размеров белковых комплексов слюны порядка от 1 нм до 1000 нм. Выбор длины волны лазерного излучения в окне прозрачности спектра поглощения воды позволяет избежать потери мощности излучения за счет поглощения и, соответственно, возбуждения молекул воды. В связи с вышесказанным для исследования водных растворов слюны оптимальным является длина волны лазерного излучения 633 нм.

Метод МАН, используемый в настоящих исследованиях, суть которого заключается в модуляции лазерного излучения частотой броуновского колебания исследуемых частиц, подразумевает, что влияние

фотонов света лазерного излучения не должно вносить значимых изменений в исследуемую систему. Таким образом, к рабочим узлам аппаратуры, одним из которых является лазерный модуль, предъявляются высокие требования.

Прибор МАН предназначен для исследования органических и неорганических наночастиц в жидкостях, в том числе биологических. По своим параметрам МАН не уступает зарубежным ЛК-спектрометрам (быстродействие составляет 1-5-10 минут в зависимости от количества накоплений), что может влиять на погрешность измерений, объем исследуемой жидкости от 0.5 мл до 5 мл, диапазон измеряемых размеров частиц от 1 нм до 10 мкм. Таким образом, результаты измерений показывают, что МАН позволяет получать достоверные результаты, а также исследовать полидисперсные растворы биологических жидкостей, такие как слюна и плазма крови. Применяемый способ позволяет оценить состояние организма путем прямого измерения распределения по размерам наноструктур в слюне человека по результатам МАН-исследования.

При исследовании параметров частиц методом МАН важно минимизировать влияние факторов на исследуемую среду, в том числе и нелинейные эффекты. Это связано с тем, что информация о размерах и процентном соотношении частиц в образце слюны связана с мощностью рассеянного ими света. Растворы наночастиц в слюне обычно малоконцентрированы и могут проявлять нелинейные свойства при взаимодействии с низкоинтенсивным лазерным излучением. В зависимости от свойств слюны и содержащихся в ней наночастиц, различных по форме и размерам нелинейность интенсивности выходного излучения в зависимости от входной интенсивности носит различный характер. Для автоматизации обработки выходных данных спектрометра МАН был использован аналого-цифровой преобразователь АЦП E20-10, поставляемый фирмой LCard в комплекте с АЦП. Это позволило записывать сигнал с МАН в цифровом формате на жёсткий диск персон-

ального компьютера. Для визуализации результатов исследования образцов применялась программа-классификатор, которая позволяла в автоматическом режиме анализировать спектры, выдавая информацию о гидродинамических размерах наночастиц и их вкладе в светорассеяние. Алгоритм работы программы-классификатора основан на т.н. методе «теория групп», когда индивидуальные спектры дифференцируются между собой в 32-мерном пространстве [46]. Для каждой из двух сравниваемых групп проводились границы зон, которые соответствовали дисперсиям распределений "две сигмы". Масштабы по осям отображались в логарифмическом масштабе. Результаты измерения образцов слюны методом МАН представляются в виде гистограмм, описывающих вид функции распределения частиц слюны по размерам (диаметру) и вкладу в светорассеяние, при этом высота пиков пропорциональна относительному вкладу частиц данного диаметра в суммарный спектр лазерного излучения в заданном частотном диапазоне. Весь диапазон спектра от 1 до 10000 нм условно разделялся на пять фракций (поддиапазонов) соответственно размерам детектируемых наночастиц: 1 – 10 нм; 11 – 30 нм; 31 – 70 нм; 71 – 150 нм; > 151 нм. Статанализ данных проводился с вычислением показателя «среднее арифметическое» и его стандартной ошибки, а в случае попарного сравнения результатов исследования, полученных от двух и более групп, – метод «попарного множественного сравнения» [47].

Для оценки достоверности показаний МАН проводились измерения опытных образцов, которые состояли из сферических наночастиц латекса диаметром 100 нм и в виде суспензии находились в водном растворе. Их размеры, полученные после обработки данных в программе-классификаторе составляли 96-102 нм. По серии проведенных измерений относительная погрешность составила не более 4%. Результаты замеров частиц латекса с диаметром 100 нм в водной суспензии показаны в Таб. 1.

Таблица 1.

Результаты замеров сферических наночастиц латекса диаметром 100 нм

№ измерения	Первая серия измерений	Вторая серия измерений
	Средние размеры наночастиц латекса, нм	
1	102	101
2	98	100
3	96	98

Важным фактором в измерениях, проводимых методом МАН, является время экспозиции. Измерения проводились несколько раз подряд (время одного измерения составляет 10 минут), пробирка с раствором не извлекалась из кюветы и воздействие на образец лазерного излучения было постоянным.

Забор слюны у пациентов проводился строго натощак, перед взятием биоматериала проводилось предварительное полоскание полости рта в течение 10-15 секунд 25-40 мл изотонического раствора натрия хлорида. Хранение образцов осуществлялось

при комнатной температуре – в течение 6 ч., при температуре от 2°C до 8°C – в течение 3 суток, при температуре минус 20°C – в течение полугода, при температуре минус 70°C – длительно.

Определение размеров наночастиц слюны проводилось следующим образом: раствор слюны в виде ротоглоточного смыва (РГС) после 10-минутного центрифугирования при 2500 об/мин микропипеткой отбирался и помещался в кювету МАН, проводилось три измерения подряд в течение 10 минут каждое, раствор постоянно находился под воздействием лазерного излучения, при комнатной температуре.

Исследования слюны в виде РГС методом МАН проводилось в «Центре европейской и восточной медицины» с 2019 по 2021 год, и были обследованы 28 пациентов с верифицированным диагнозом НЯК. Большинство обследованных (более 80%) пациентов были в возрасте от 31 до 48 лет. Более половины из них составили женщины. Заключение о состоянии здоровья давалось на основании результатов комплексного медицинского обследования больных в медицинских учреждениях по месту жительства. Обследование пациентов с НЯК проводили в соответствии со стандартом ведения стационарного больного, начиная с жалоб и сбора анамнеза (присутствие болевого синдрома, объема и кратности стула, наличие примесей крови и слизи в кале, снижение массы тела, признаки поливитаминовой недостаточности: ломкость ногтей, сухость кожи, выпадение волос, сглаженные сосочки языка, снижение зрения). Всем больным выполняли традиционные лабораторные исследования (общий и биохимический анализ крови), методом иммуноферментного анализа проводилось определение концентрации иммуноглобулинов, молекул межклеточной адгезии (sICAM-1, sICAM-2, sICAM-3, интерлейкина-6 и TFR- β в сыворотке крови). Состояние кишечника оценивалось по критериям копрограммы, активности микробиоты (на основании анализа короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК), а также анализа кала на скрытую кровь, активности воспалительного процесса (по данным анализа кала на кальпротектин, результатам эндоскопического исследования с биопсией) и по инструментальным методам обследования (УЗИ органов брюшной полости, эзофагогастродуоденоскопия, колоноскопия с биопсией, рентгенологическое исследование тонкой кишки и компьютерная томография (по показаниям с целью дифференциальной диагностики). По преобладающей симптоматике основного патологического процесса исследуемые были разделены на три группы: основную (больные с верифицированными случаями НЯК) – 28 случаев, группу сравнения (больные с общесоматическими заболеваниями толстого кишечника воспалительного этиопатогенеза) – 32 наблюдения, и контрольную группу (практически здоровые пациенты) – 30 случаев. Всем пациентам проводилась лазерная спектроскопия слюны.

1 группа была представлена больными, у которых был верифицирован диагноз НЯК. Были выявлены следующие формы НЯК по локализации: неспецифический язвенный проктит и проктосигмоидит – 8 случаев; неспецифический язвенный левосторонний колит – 5 случаев; неспецифический язвенный тотальный колит – 6 случаев; неспецифический язвенный регионарный колит – 9 случаев.

По течению выделялись: острый неспецифический язвенный колит – 5 наблюдений; хронический неспецифический язвенный колит – 15 наблюдений; рецидивирующий неспецифический язвенный колит – 8 наблюдений.

По тяжести заболевания больные распределялись следующим образом: с легкой формой заболевания – 17 пациентов; со средней степенью тяжести – 7 пациентов; с тяжелой формой течения болезни – 4 пациента.

Вторая группа больных состояла из пациентов с общесоматическими заболеваниями и объективно установленным и морфологически подтвержденным диагнозом, среди которых наиболее часто встречались хронические колиты (катаральные, атрофические и смешанные).

Третья группа была представлена практически здоровыми людьми, при углубленном обследовании которых не было выявлено патологии.

Осмотр пациентов "узкими" специалистами (гастроэнтеролог, онколог, иммунолог, хирург и др.) проводился по показаниям.

Формирование обследуемых групп проводилось по правилам проведения клинических испытаний, у всех пациентов было взято «информированное согласие» на участие в исследованиях. Научно-исследовательская работа проводилась в соответствии с Хельсинкской декларацией (2013 г.), и была предварительно одобрена «Комитетом по этике».

Статистическая обработка полученных результатов исследования проводилась с использованием программного обеспечения Statistica 10.0, а также корреляционно-регрессионным анализом. Изучалась зависимость между относительным вкладом в светорассеивание монохроматического лазерного излучения на наночастицах слюны и их диаметров.

Требования к забору слюны сводились к следующему: после ополаскивания водой ротовой полости слюна собиралась в пластиковую пробирку или «контейнер для забора биоматериала» натошак не ранее 4-х часов с момента последнего приема пищи и/или медикаментов, к ней добавлялось 5 мл физиологического раствора хлорида натрия (в таком виде РГС может храниться до исследования неограниченное время при температуре -20-30 градусов Цельсия в морозильной камере холодильника). Затем образец РГС помещался в центрифужную пробирку и проводилось центрифугирование при 2500 об/мин, после которого надосадочная жидкость помещалась в кювету лазерного спектрографа для проведения самого исследования.

Проведенный на предварительном этапе работы анализ зависимости спектров слюны от возраста, пола, сезона и этнической принадлежности показал, что влияние вышеперечисленных факторов на спектроскопические характеристики ничтожно малы и ими можно пренебречь.

Результаты

Исследование было подразделено на несколько этапов, первым из которых являлось определение характерных особенностей спектра РГС практически здоровых людей. На Рис. 2 представлен наиболее типичный спектр РГС практически здоровых людей.

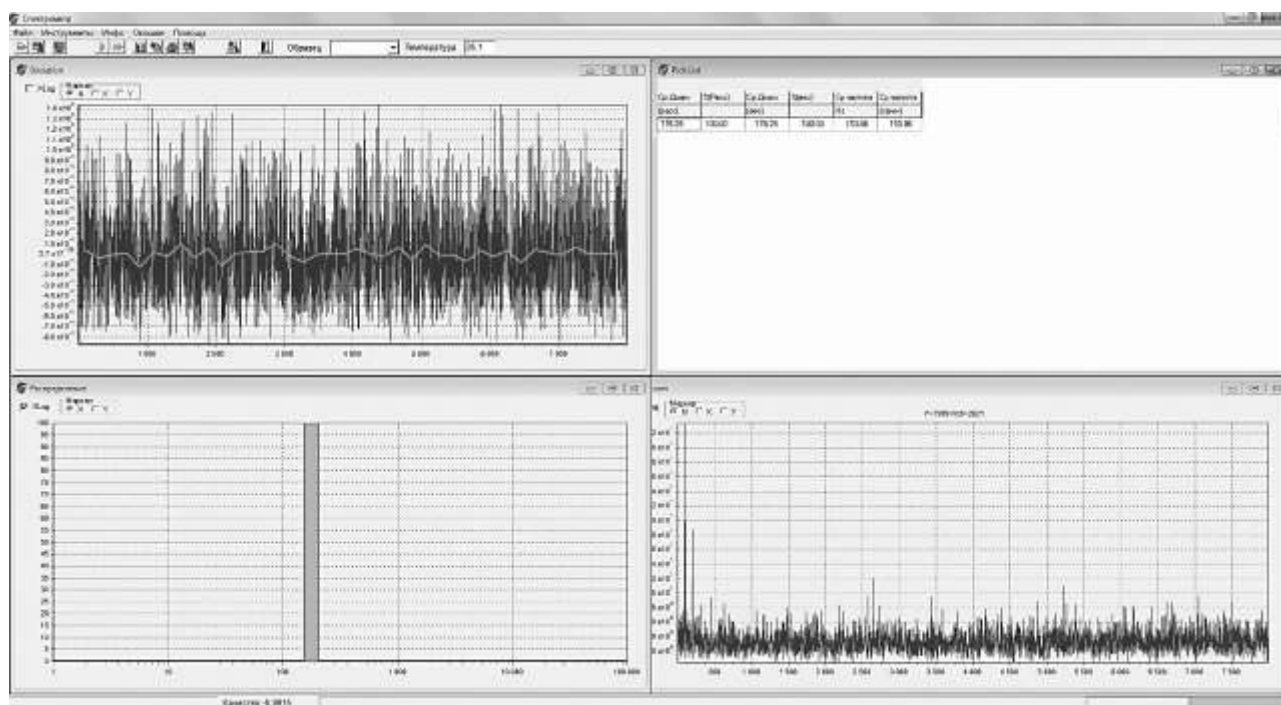


Рисунок 2. Наиболее типичный спектр РГС практически здоровых людей

Основными особенностями, характеризующими РГС-спектры практически здоровых людей, являлись мономодальность распределения частиц слюны по размеру: максимальный вклад (100%) в светорассеяние на наночастицах среднего гидродинамического диаметра 178 нм и отсутствие наночастиц в спектральных поддиапазонах 0-178 нм и 179-5000 нм, что позволяет использовать данные усреднённые значения в качестве референтных показателей при дальнейших расчетах.

Второй этап исследований проводился с целью определения сдвигов в субфракциях наночастиц пациентов с наиболее распространёнными общесоматическими воспалительными заболеваниями толстого кишечника. На *Рис. 3* представлен наиболее типичный спектр РГС пациентов с хроническим катаральным колитом.

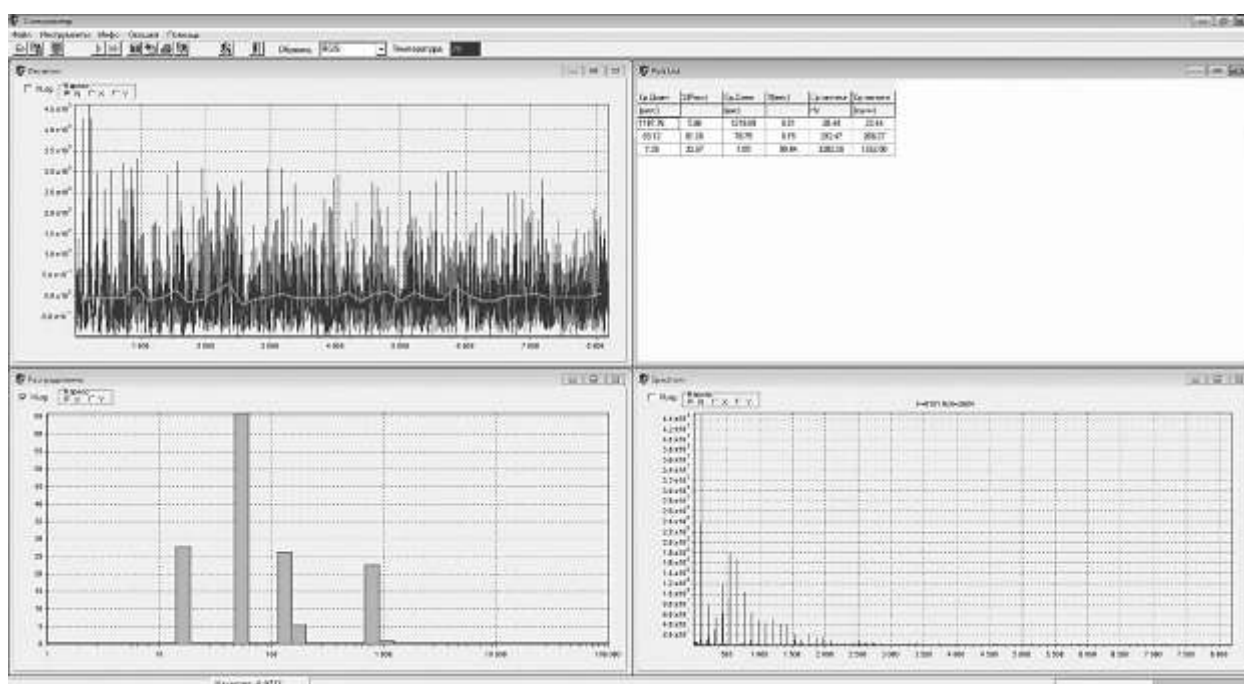


Рисунок 3. Наиболее типичный спектр РГС пациентов с хроническим колитом

РГС-спектры лиц с общесоматическими заболеваниями характеризовались четырьмя пиками (модами) распределения частиц слюны по размеру, с наибольшим вкладом (61%) в светорассеяние на наночастицах среднего спектрального диапазона с размерами от 83 нм до 120 нм, при 33%-ном вкладе

в светорассеяние на мелких частицах в диапазоне от 1 нм до 25 нм, а также наночастиц крупного диапазона спектра свыше 1000 нм при 6%-ном вкладе в рассеяние света.

На Рис. 4 показан наиболее типичный спектр слюны больных с НЯК.

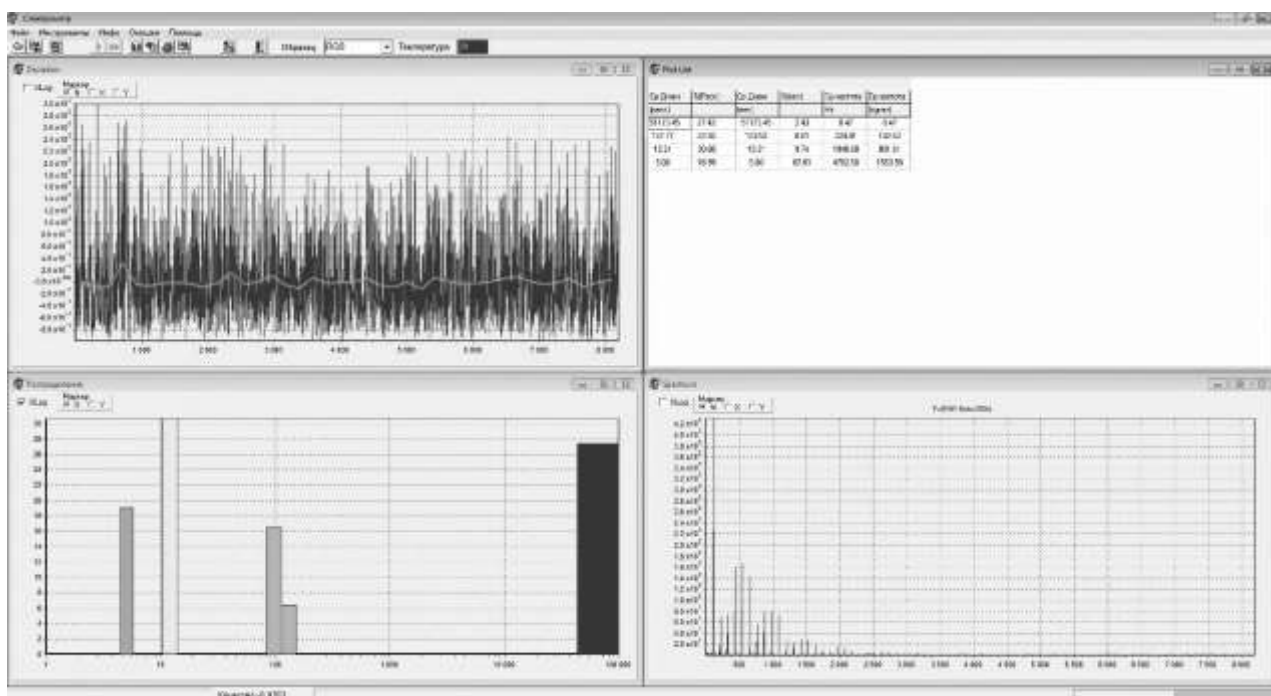


Рисунок 4. Наиболее типичный спектр РГС больных с НЯК

Наиболее типичная гистограмма распределения наночастиц по размеру и вкладу в светорассеяние у больных с НЯК характеризовалась четырёхмодальностью и преимущественностью рассеяния света на частицах малого диаметра (ЧМД) 5,0 нм и 12,2 нм при соответственном вкладе в светорассеяние 19% и 31% (суммарно – 50%), вклад наночастиц среднего диаметра 107,8 нм составлял 23%, крупных частиц размером более 1000 нм – 27%.

Из графической информации, представленной на рисунках 2-4, следует, что в отличие от спектров

РГС практически здоровых людей спектральные характеристики РГС пациентов с НЯК и ВЗК характеризуются повышенным вкладом в рассеяние света на ЧМД. В дополнение к этому спектры слюны больных с НЯК статистически достоверно ($p < 0,001$) дифференцируются от таковых у больных хроническими колитами наличием агломератов крупных частиц и значительно более высоким светорассеянием на мелких наночастицах.

Таблица 2.

Степени дифференцированности спектров РГС пациентов с ВЗК и НЯК, %

Нозология	Практическое здоровье	Хронический колит	Неспецифический язвенный колит
Практическое здоровье	-	85	90
Хронический колит	85	-	78
Неспецифический язвенный колит	90	78	-

Как показано в Таб. 2, спектры РГС больных с ВЗК и НЯК статистически достоверно ($p < 0,001$) дифференцируются между собой и от РГС-спектров практически здоровых людей.

Ранее проведённая оценка диагностической информативности метода МАН использовалась для

расчета у здоровых лиц - для установления показателя диагностической специфичности, у больных - для установления показателя диагностической чувствительности; во всех группах обследуемых - для расчета показателя диагностической эффективности теста.

Диагностическая чувствительность (1) представляла собой процентное выражение частоты истинно положительных результатов исследования субфракционного состава слюны у больных с НЯК:

$$\text{Диагностическая чувствительность} = \frac{\text{ИП}}{(\text{ИП} + \text{ЛО})} \times 100\% \quad (1)$$

где ИП - истинно положительные результаты, ЛО - ложноотрицательные результаты.

Диагностическая специфичность (2) теста оценивалась как процентное выражение частоты истинно отрицательных результатов у здоровых лиц:

$$\text{Диагностическая специфичность} = \frac{\text{ИО}}{(\text{ИО} + \text{ЛП})} \times 100\% \quad (2)$$

где ЛП - ложноположительные результаты, ИО - истинно отрицательные результаты.

Диагностическая эффективность (3) метода определялась процентным отношением истинных, т.е. соответствующих состоянию обследуемых пациентов результатов теста к общему числу полученных результатов:

$$\text{Диагностическая эффективность} = \frac{(\text{ИО} + \text{ИП})}{(\text{ИП} + \text{ИО} + \text{ЛП} + \text{ЛО})} \times 100\% \quad (3)$$

Показатель предсказательной ценности положительного результата (4) рассчитывался по формуле:

$$\text{Предсказательная ценность положительного результата} = \frac{\text{ИП}}{(\text{ИП} + \text{ЛП})} \times 100\% \quad (4)$$

и применялся для оценки вероятности наличия заболевания у обследуемого с положительным результатом теста.

Показатель предсказательной ценности отрицательного результата (5) рассчитывался по формуле:

$$\text{Предсказательная ценность отрицательного результата} = \frac{\text{ИО}}{(\text{ИО} + \text{ЛО})} \times 100\% \quad (5)$$

и применялся для оценки вероятности отсутствия заболевания у обследуемого с отрицательным результатом тестирования.

Показатель диагностической специфичности метода МАН, вычисленный по группе практически здоровых лиц, составил 94%, диагностическая чувствительность метода в отношении НЯК составила 90%, показатель диагностической эффективности составлял 85%, предсказательная ценность положительного результата - 92%, предсказательная ценность отрицательного результата - 78%.

В наше исследование было включено лишь 28 пациентов с НЯК и поэтому представленные результаты могут иметь ориентировочный характер. Для более точной оценки чувствительности теста требуется исследование слюны большего числа пациентов. Тем не менее представленные результаты

научного исследования демонстрируют перспективность дальнейшей работы в этом направлении по оптимизации метода МАН для задач по диагностике НЯК и ВЗК. В частности, планируется работа по уточнению биохимической природы мелких частиц (предположительно экзосом) и разработке диагностического алгоритма, основанного на новейших разработках в области искусственного интеллекта. Решение этих вопросов позволит внести усовершенствования в разработанный метод скрининга и ранней диагностики НЯК, способный успешно конкурировать с другими диагностическими тест-системами.

Общеизвестно, что на доклинической стадии и при латентном течении болезни пациенты с ВЗК и НЯК могут не предъявлять патогномичных жалоб, и лишь при манифестации патологического процесса у больных может возникать характерная клиническая симптоматика, заставляющая его обратиться к врачу. Но, как свидетельствуют статистические данные, такое обращение является запоздалым в связи с уже имеющимися осложнениями и системными проявлениями заболевания, что не даёт возможности ни пациенту, ни врачу надеяться на радикальность лечения. Именно поэтому актуальным является применение МАН для ранней неинвазивной диагностики НЯК, когда в связи со своевременным выставленным диагнозом лечебные мероприятия будут являться максимально эффективными.

Обсуждение

Таким образом, слюна, как и кровь, содержит множество наночастиц, включая молекулы белка и нуклеиновых кислот, что отражает патофизиологический статус пациента (его гомеостаз) на момент исследования; однако, в отличие от других биологических жидкостей, диагностика ВЗК и НЯК по слюне предлагает простой, недорогой, безопасный и неинвазивный подход для выявления местных и органических патологических процессов, и обладает высоким потенциалом как один из элементов развития современных высокоточных методов лабораторной диагностики. МАН позволяет выявить и оценить изменения в системе гомеостаза неинвазивным способом – по слюне, обеспечивая при этом высокую точность и экспрессность исследований. Исследования выполняются с минимальным объемом РГС, подготовка которого обеспечивает сохранение уникальной нативной структуры ее частиц, с быстрой регистрацией математически обработанных результатов.

Как было показано, в ходе проведения многоэтапных спектрометрических исследований РГС у больных НЯК в образцах слюны обнаруживались мелкие наночастицы с относительно высоким вкладом в светорассеяние и крупные агрегаты частиц свыше 1000 нм, что наиболее вероятно связано с имеющимися место в организме больного процессами иммунореактивности, т.е. фиксируемой способностью иммунной системы отвечать на действие антигена специфическими по отношению к нему клеточными

и гуморальными реакциями - выработкой антител и образованием наночастиц, образующихся в организме при сопутствующих основному диагнозу синдромальных сдвигах в системе гомеостаза. В более чем в 90% случаев исследований программно-классификатором МАН у больных с НЯК регистрировались патофизиологические нарушения, а именно: интоксикационного, катаболического, воспалительного, аутоиммунного и дегенеративно-дистрофического характера, что, наиболее вероятно, было обусловлено сочетанной вовлечённостью органов и систем в патологический процесс.

Выводы

Таким образом, значение слюны как биоматериала для трудно переоценить, что делает необходимым рассматривать МАН в качестве альтернативного существующим методам диагностики неспецифического язвенного колита. Как было показано, метод МАН позволяет статистически достоверно дифференцировать ВЗК и НЯК.

Учитывая большое количество людей, генетически предрасположенных к НЯК, во всём мире возрастает обеспокоенность его настоящими и долгосрочными последствиями, что послужило поводом к изучению актуальной проблемы современного человечества – борьбе с возрастающей заболеваемостью НЯК и разработке более совершенных и объективных методов его доклинической диагностики. В представленной работе представлена информация об аппаратно-диагностическом комплексе МАН, разработанном для проведения количественного анализа молекулярного состава биологических жидкостей, в частности, по ротоглоточным смывам.

Отличительными особенностями разработанной схемы являются: оригинальная система регистрации данных на фотоприёмнике с использованием детекции рассеянного света через систему призмных поляризаторов и фотоэлектронного умножителя, а также аналого-цифровой платы для оцифровки данных. Обработка данных, а именно вычисление автокорреляционной функции и дальнейший её анализ, производится на компьютере, что позволяет сделать схему МАН мобильной и доступной. Разработанная программа обработки данных (классификатор), вместе с подобранными параметрами схемы регистрации сигналов рассеяния позволяет добиться точности определения размеров наночастиц в полидисперсных растворах до 0.1-0,5 нм. Модельные эксперименты, проведенные на латексных наносферах, подтвердили точность разработанного прибора. По сравнению с прочими методами медицинских и биологических исследований, аппаратно-диагностический комплекс МАН обладает рядом неоспоримых преимуществ, а именно: имеет широкий диапазон исследуемых

фракций, позволяет проводить одновременный анализ субфракций размером от мономерных наночастиц до высокополимерных иммунных комплексов, требует минимальное количество исследуемого материала, забор которого прост и неинвазивен, а также не требует сложных процедур подготовки образцов к исследованию, обладает высокой скоростью измерений, достаточными показателями чувствительности и специфичности для проведения широкомасштабного скрининга населения для выявления НЯК.

В работе был описан алгоритм исследования нативной биологической жидкости (слюны), представлены принципиальная схема и принцип работы монохромного анализатора наночастиц, разработаны правила забора биоматериала и подготовки образцов слюны к исследованию, дано подробное описание процессу формирования групп пациентов и этапов исследования. Установлено, что спектр практически здоровых людей имеет бимодальное распределение наночастиц по размеру с преимущественным (более 75%) вкладом в светорассеяние на частицах среднего поддиапазона спектра. Спектральные характеристики больных с НЯК статистически достоверно ($p < 0,001$) дифференцируются от спектров слюны практически здоровых лиц и пациентов с ВЗК общесоматической природы высокими показателями вклада в светорассеяние на частицах малого и сверхкрупного гидродинамического диаметра.

Неоспоримыми преимуществами МАН для целей неинвазивной диагностики НЯК являются:

- объективность получаемых результатов тестирования;
- возможность достоверного определения НЯК и ВЗК;
- неинвазивность забора биоматериала, что практически исключает вероятность заражения медперсонала заболеваниями, передающимися через кровь;
- быстрое получение результатов тестирования;
- низкая стоимость.

Внедрение МАН-диагностики в практическое здравоохранение позволит врачам проводить дифференциальную диагностику заболеваний толстого кишечника у пациентов с подозрением на неспецифический язвенный колит и оперативно определяться с методами лечения для предупреждения его осложнений, а также контролировать эффективность лечения и динамику его результатов.

Материалы данного научного исследования по практическому применению его результатов могут быть впоследствии рекомендованы медицинским организациям практического здравоохранения для включения данного метода в программу диспансеризации населения.

Список литературы:

1. Cosnes J., Gower-Rousseau C., Seksik P., Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011;140:1785–94. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.01.055>

2. Белоусова Е.А., Абдулганиева Д.И., Алексеева О.П., Алексеенко С.А., Барановский А.Ю., Валуйских Е.Ю., Головенко А.О., Головенко О.В., Жигалова Т.Н., Князев О.В., Куляпин А.В., Лахин А.В., Ливзан М.А., Лубянская Т.Г., Николаева Н.Н., Никитина Н.В., Никулина И.В., Осипенко М.Ф., Павленко В.В., Парфенов А.И., Рогачиков Ю.Е., Светлова И.О., Ткачев А.В., Ткаченко Е.И., Халиф И.Л., Чашкова Е.Ю., Щукина О.Б., Язенок Н.С., Яковлев А.А. Социально-демографическая характеристика, особенности течения и варианты лечения воспалительных заболеваний кишечника в России. Результаты двух многоцентровых исследований. Альманах клинической медицины. 2018;46(5):445-463. <https://doi.org/10.18786/2072-0505-2018-46-5-445-463>. [Belousova E.A., Abdulganieva D.I., Alexeeva O.P., Alexeenko S.A., Baranovsky A.Yu., Valuyskikh E.Yu., Golovenko A.O., Golovenko O.V., Zhigalova T.N., Knyazev O.V., Kulyapin A.V., Lakhin A.V., Livzan M.A., Lubyanskaya T.G., Nikolaeva N.N., Nikitina N.V., Nikulina I.V., Osipenko M.F., Pavlenko V.V., Parfenov A.I., Rogachikov Y.E., Svetlova I.O., Tkachev A.V., Tkachenko E.I., Khalif I.L., Chashkova E.Yu., Shchukina O.B., Yazenok N.S., Yakovlev A.A. Social and demographic characteristics, features of disease course and treatment options of inflammatory bowel disease in Russia: results of two multicenter studies]. Almanac of Clinical Medicine. 2018;46(5):445-463. (In Russ.) <https://doi.org/10.18786/2072-0505-2018-46-5-445-463>
3. Katsanos K.H., Vermeire S., Christodoulou D.K., Riis L., Wolters F., Odes S., Freitas J., Ole Hoie, Beltrami M., Fornaciari G., Clofent J., Bodini P., Vatn M., Nunes P.B., Moum B., Munkholm P., Limonard C., Stockbrugger R., Rutgeerts P., Tsianos E.V. Dysplasia and cancer in inflammatory bowel disease 10 years after diagnosis: results of a population-based European collaborative follow-up study. *Digestion*. 2007;75:113–21. <https://doi.org/10.1159/000104731>
4. Silverberg M.S., Satsangi J., Ahmad T., Arnott I., Bernstein C., Brant S.R., Caprilli R., Colombel J., Gasche C., Geboes K., Jewell D.P., Karban A., Loftus E.V., Peña A.S., Riddell R.H., Sachar D.B., Schreiber S., Steinhart A.H., Targan S.R., Vermeire S., Warren B.F. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a working party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol*. 2005;19:5–36. <https://doi.org/10.1155/2005/269076>
5. Truelove S.C., Witts L.J. Cortisone in ulcerative colitis; ènal report on a therapeutic trial. *Br Med J*. 1955;2:1041–8. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.4947.1041>
6. Seah D., Cruz P.D. Review article: the practical management of acute severe ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016;43(4):482-513. <https://doi.org/10.1111/apt.13491>
7. Hindryckx P., Jairath V., Haens G.D. Acute severe ulcerative colitis: from pathophysiology to clinical management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;13(11):654-664. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.116>
8. Chen J.H., Andrews J.M., Kariyawasam V., Moran N., Gounder P., Collins G., Walsh A.J., Connor S., Lee T.W., Koh C.E., Chang J., Paramsothy S., Tattersall S., Lemberg D.A., Radford-Smith G., Lawrance I.C., McLachlan A., Moore G.T., Corte C., Katelaris P., Leong R.W. IBD Sydney Organisation and the Australian Inflammatory Bowel Diseases Consensus Working Group. Review article: acute severe ulcerative colitis - evidence-based consensus statements. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016;44(2):127-44. <https://doi.org/10.1111/apt.13670>
9. Schroeder K.W., Tremaine W.J., Ilstrup D.M. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med*. 1987;317:1625-9. <https://doi.org/10.1056/NEJM198712243172603>
10. Sands B.E. From symptom to diagnosis: clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation. *Gastroenterology*. 2004;126:1518–32. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.02.072>
11. Perler B., Ungaro R., Baird G., Malette M., Bright R., Shah S., Shapiro J., Sands B.E. Presenting symptoms in inflammatory bowel disease: descriptive analysis of a community-based inception cohort. *BMC Gastroenterol*. 2019;19:47. <https://doi.org/10.1186/s12876-019-0963-7>
12. Fine K.D., Schiller L.R. AGA technical review on the evaluation and management of chronic diarrhea. *Gastroenterology*. 1999;116:1464–86. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(99\)70513-5](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(99)70513-5)
13. Forrest K., Symmons D., Foster P. Systematic review: is ingestion of paracetamol or non-steroidal anti-inflammatory drugs associated with exacerbations of inflammatory bowel disease? *Aliment Pharmacol Ther*. 2004;20:1035–43. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2004.02270.x>
14. Mahid S., Minor K.S., Soto R.E., Hornung C.A., Galandiuk S. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc*. 2006;81:1462–71. <https://doi.org/10.4065/81.11.1462>
15. Vermeire S. Review article: genetic susceptibility and application of genetic testing in clinical management of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;24:2–10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2006.03052.x>
16. Harbord M., Eliakim R., Bettenworth D., Karmiris K., Kopylov U., Kucharzik T., Molnár T., Raine T., Sebastian S., de Sousa H.T., Dignass A., Carbonnel F.; European Crohn's and Colitis Organisation [ECCO]. Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 2: Current Management. *J Crohns Colitis*. 2017;11(7):769-84. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjx009>
17. Ungaro R., Mehandru S., Allen P.B., Peyrin-Biroulet L., Colombel J. Ulcerative colitis. *Lancet*. 2017; 389(10080):1756-1770. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32126-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32126-2)

18. Costa F., Mumolo M.G., Bellini M., Romano M.R., Ceccarelli L., Arpe P., Sterpi C., Marchi S., Maltintiet G. Role of faecal calprotectin as non-invasive marker of intestinal inflammation. *Dig Liver Dis.* 2003;35:642–7. [https://doi.org/10.1016/s1590-8658\(03\)00381-5](https://doi.org/10.1016/s1590-8658(03)00381-5)
19. Levin A., Yaari S., Stoff R., Caplan O., Wolf D.G., Israeli E. Cytomegalovirus Infection during Exacerbation of Ulcerative Colitis. *Digestion.* 2017;96(3):142-148. <https://doi.org/10.1159/000479865>
20. Parente F., Greco S., Molteni M., Cucino C., Maconi G., Sampietro G.M., Danelli P.G., Cristaldi M., Bianco R., Gallus S., Porro B.G. Role of early ultrasound in detecting inflammatory intestinal disorders and identifying their anatomical location within the bowel. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics.* 2003;18:1009-1016. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2003.01796.x>
21. Masopust D., Choo D., Vezys V., Wherry E.J., Duraiswamy J., Akondy R., Wang J., Casey K.A., Barber D.L., Kawamura K.S., Fraser K.A., Webby R.J., Brinkmann V., Butcher E.C., Newell K.A., Ahmed R. Dynamic T cell migration program provides resident memory within intestinal epithelium. *J Exp Med.* 2010;207(3):553-64. <https://doi.org/10.1084/jem.20090858>
22. Hart A.L., Al-Hassi H.O., Rigby R.J., Bell S.J., Emmanuel A.V., Knight S.C., Kamm M.A., Stagg A.J. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 2005;129(1):50-65. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.05.013>
23. Wang Z., Shi K., Peng J. Serologic testing of a panel of five antibodies in inflammatory bowel diseases: Diagnostic value and correlation with disease phenotype. *Biomed. Reports.* 2017;6:401-410. <https://doi.org/10.3892/br.2017.860>
24. Mitsuyama K., Niwa M., Takedatsu H., Yamasaki H., Kuwaki K., Yoshioka S., Yamauchi R., Fukunaga S., Torimura T. Antibody markers in the diagnosis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2016;22(3):1304-1310 <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i3.1304>
25. Barber G.N. Cytoplasmic DNA innate immune pathways. *Immunol Rev.* 2011;243(1):99-108. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01051.x>
26. Brimnes J., Alex M., Dothan I. Defects in CD8+ regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease. *J. Immunol.* 2005;174:5814-5822. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.9.5814>
27. Makita S., Kanai T., Oshima S. CD4+CD25 bright T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells. *J. Immunol.* 2004;173:3119-3130. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.5.3119>
28. Kawasaki T., Kawai T., Akira S. Recognition of nucleic acids by pattern-recognition receptors and its relevance in autoimmunity. *Immunol Rev.* 2011;243(1):61-73. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01048.x>
29. Gulari E., Chu B., Gulari E., Tsunashima Y. Photon correlation spectroscopy of particle distributions. *Journal of Chemical Physics.* 1979;70:3965-3972. <https://doi.org/10.1063/1.437950>
30. Величко Е.Н., Непомнящая Э.К., Соколов А.В., Кудряшова Т.Ю. Лазерный корреляционный спектрометр для оценки размеров и динамики изменения размеров структур в биологических жидкостях. *Оптика и спектроскопия.* 2020;129(7):950. [Velichko E.N., Nepomnyashchaya E.K., Sokolov A.V., Kudryashova T.Yu. Laser Correlation Spectrometer for Assessing the Size and Dynamics of Changes in the Size of Structures in Biological Fluids]. *Optics and Spectroscopy.* 2020;128:959–963. <https://doi.org/10.21883/OS.2020.07.49567.63-20>
31. Stetefeld J., McKenna S.A., Patel T.R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews.* 2016;8:409-427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>
32. Lebedev A.D., Ivanova M.A., Lomakin A.V., Noskin V.A. Heterodyne quasi-elastic light-scattering instrument for biomedical diagnostics. *Appl Opt.* 1997;36(30):7518-<https://doi.org/10.1364/ao.36.007518>
33. Ломакин А.В. Изучение внутренней динамики макромолекул методом лазерной корреляционной спектроскопии. *УФН* 1987;153:360–362. [Lomakin A.V. Study of the internal dynamics of macromolecules by the method of laser correlation spectroscopy *Sov. Phys. Usp.* 1987;30:914–916]. <https://doi.org/10.3367/UFNr.0153.198710j.0360>
34. Kotov O.I., Liokumovich L.B., Markov S.I., Medvedev A.V., Nikolaev V.M. Remote interferometer with polarizing beam splitting. *Tech. Phys. Lett.* 2000;26:415–417. <https://doi.org/10.1134/1.1262863>
35. Максимова Е.А., Бурейко С.Ф., Левин С.Б., Державец Л.М. Метод двумерной корреляционной спектроскопии для улучшения аппроксимации одномерных спектров. *Химическая физика.* 2015;34(8):55-57. [Maksimova E.A., Bureiko S.F., Levin S.B., Derzhavets L.M. Russian Journal of Physical Chemistry. 2015;9:558-560]. <https://doi.org/10.7868/S0207401X15080130>
36. Liokumovich L.B., Kostromitin A.O., Ushakov N.A., Kudryashov A.V. Method for Measuring Laser Frequency Noise. *J Appl Spectrosc.* 2020;86:1106–1112. <https://doi.org/10.1007/s10812-020-00947-x>
37. Mogridge J. Using light scattering to determine the stoichiometry of protein complexes. *Methods Mol Biol.* 2004; 261:113-8. <https://doi.org/10.1385/1-59259-762-9:113>
38. Gast K., Fiedler C. Dynamic and static light scattering of intrinsically disordered proteins. *Methods Mol Biol.* 2012; 896:137-61. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3704-8_9

39. Николаев А.И., Антонова И.Н., Донская О.С., Владимирова Л.Г. Алгоритм анализа ЛК-спектров для неинвазивной диагностики заболеваний по образцам ротоглоточного смыва. Медицинский алфавит. 2019;4(35):23-27. [Nikolaev A.I., Antonova I.N., Donskaya O.S., Vladimirova L.G. LC-spectra analysis algorithm for non-invasive diagnostics by oropharyngeal washout samples]. Medical alphabet. 2019;4(35):23-27. [https://doi.org/10.33667/2078-5631-2019-4-35\(410\)-23-27](https://doi.org/10.33667/2078-5631-2019-4-35(410)-23-27)
40. Малек А.В., Самсонов Р.В., Къези А. Перспективы разработки методов диагностики и мониторинга онкологических заболеваний на основе анализа экзосом, секретируемых опухолевыми клетками. Российский биотерапевтический журнал. 2015;14(4):9-18. [Malek A.V., Samsonov R.V., Chiesi A. Development of cancer diagnostics and monitoring methods based on analysis of tumor-derived exosomes. Russian Journal of Biotherapy. 2015;14(4):9-18. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2015-14-4-9-18>
41. Südhof T. The molecular machinery of neurotransmitter release (Nobel lecture). Angew Chem Int Ed Engl. 2014;53(47):126-717. <https://doi.org/10.1002/anie.201406359>
42. Liokumovich L., Muravyov K., Skliarov P., Ushakov N. Signal detection algorithms for interferometric sensors with harmonic phase modulation: miscalibration of modulation parameters. Applied Optics. 2018;57:7127-7134. <https://doi.org/10.1364/AO.57.007127>
43. Stetefeld J., McKenna S.A., Patel T.R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. Biophys. Rev. 2016;8:409-427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>
44. Носкин В.А. Лазерная корреляционная спектроскопия квазиупругого рассеяния. УФН 1987;(153):358-360. [Noskin V.A. Laser correlation spectroscopy of quasielastic scattering. Sov. Phys. Usp. 1987;(30):913-914]. <https://doi.org/10.1070/PU1987v030n10ABEH002972>
45. Chayen N., Dieckmann M., Dierks K., Fromme P. Ann N.Y. Size and shape determination of proteins in solution by a noninvasive depolarized dynamic light scattering instrument. Acad Sci. 2004;1027:20-7. <https://doi.org/10.1196/annals.1324.003>
46. Nepomniashchaia E.K., Velichko E.N., Aksenov E.T. Inverse problem of laser correlation spectroscopy for analysis of polydisperse solutions of nanoparticles. Journal of Physics: Conference Series, Volume 769 012025. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/769/1/012025>
47. Xu R. Light scattering: A review of particle characterization applications. Particuology. 2015;18:11-21. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2014.05.002>