

## КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПАРАЛЛЕЛИ ПРИ ОСТРОМ ПАНКРЕАТИТЕ

Бугаенко О.А., Михайличенко В.Ю., Кубышкин А.В., Старых А.А.

*Медицинская академия имени С.И. Георгиевского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» Министерства образования и науки Российской Федерации, Россия, Республика Крым, г. Симферополь, e-mail: pancreas1978@mail.ru*

Проведенные исследования на 26 белых крысах-самцах линии Вистар продемонстрировали, что при развитии экспериментального панкреатита происходит активация протеиназ как местно в перитонеальной жидкости, так и системно – в крови, и дистанционно – в легких. Наиболее выраженной была активация эластазы, как на местном, так и на системном уровне. Это может свидетельствовать о важной роли активации эластазы в патогенезе панкреатита, а на местном уровне эластаза может быть ведущим ферментом, который приводит к деструкции поджелудочной железы. Незначительное увеличение антитрипсиновой активности в перитонеальном секрете и ее снижение в крови свидетельствует про неадекватный контроль со стороны ингибиторов над увеличением активности протеиназ. Адекватное повышение антитрипсиновой активности определяется только в бронхоальвеолярном секрете, что вероятно носит компенсаторный характер и является одним из факторов защиты легких от системной протеолитической агрессии. При обследовании перитонеальной жидкости в клинике у пациентов с острым панкреатитом в клинической практике, проведены параллели между тяжестью течения заболевания и активностью протеиназ-ингибиторной системы, которая обладает высокой чувствительностью. Вышеперечисленные факторы позволяют рекомендовать использовать показатели протеиназ-ингибиторной системы при остром панкреатите в клинической практике для прогнозирования течения воспаления в ткани поджелудочной железы и эффективности проводимых лечебных мероприятий.

Ключевые слова: острый панкреатит, протеиназ-ингибиторная система, патогенез.

## CLINICAL AND DIAGNOSTIC PARALLELS IN ACUTE PANCREATITIS

Bugaenko O.A., Mikhaylichenko V.Y., Kubyshkin A.V., Starykh A.A.

*Medical Academy named after S.I. Georgievskiy, The Federal State Autonomous Educational Establishment of Higher Education "Crimean Federal University named after V.I. Vernadsky" Ministry of Education and Science of the Russian Federation, Russia, Republic of Crimea, Simferopol, e-mail: pancreas1978@mail.ru.*

Studies on 26 white male Wistar rats have demonstrated that the development of experimental pancreatitis activates proteases, locally in the peritoneal secret, systematically – at the blood level, and distantly – at the lung level. The activation of is the most pronounced, elastase at both the local and systemic levels. This may be indicative of the important role of elastase activation in the pathogenesis of pancreatitis, in which, at the local level, the elastase can be a leading enzyme that leads to destruction of the pancreas. A slight increase in the antiprotease activity in the peritoneal secret and its reduction in the blood indicate that the inhibitors control the increase in the activity of proteases inadequately. An adequate raise of the antiprotease activity is observed only in the bronchoalveolar secret, which apparently is of a compensatory character and appears to be a factor protecting the lungs from systemic proteolytic aggression. In the study of the peritoneal fluid from patients with acute pancreatitis in clinical practice, we can see the parallels between the severity of the disease and the activity of proteinase-inhibitor system, which has high sensitivity. These factors make it possible to recommend to use indicators of the proteinase inhibitor system in acute pancreatitis in clinical practice for predicting the course of inflammation in pancreatic tissue and effectiveness of the treatment measures.

Keywords: acute pancreatitis, proteinase-inhibitor system, pathogenesis.

Острый панкреатит в настоящее время занимает одно из первых мест в списке «острого живота». Тем не менее до сих пор продолжают споры о лечебной тактике, вызванной отсутствием единой классификации и диагностико-тактического алгоритма [1]. Внутриклеточная активация протеолитических и других ферментов (эластазы, фосфолипазы А2) при остром панкреатите приводит к выбросу преобладающих цитокинов - интерлейкинов ИЛ-1бета, ИЛ-6, ИЛ-8,

фактора активации тромбоцитов, фактора некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ альфа), некоторые из которых через систему рецептор взаимодействующих протеинкиназ вызывают активацию нуклеарного фактора, который является ответственным за синтез провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, а также за апоптоз [2,5]. На практике часто встречаются инфицированные формы болезни, характеризующиеся высокой интоксикацией организма и диффузным, без четких границ распространением инфекционного процесса по забрюшинной клетчатке [3]. До сих пор не существует универсального маркера диагностики и прогнозирования течения острого панкреатита в клинической практике. Имеются сложные исследования и интегральные показатели, по которым можно отследить течение острого панкреатита и оценить адекватность проводимой терапии, однако, они по техническим причинам не выполнимы повседневно в монопрофильных обычных больницах, что требует поиска более простого и точного метода диагностики [4].

**Цель** – изучить диагностическую значимость протеиназ-ингибиторной системы при остром панкреатите в эксперименте и клинике.

#### **Материалы и методы**

Экспериментальные исследования проведены на 26 белых крысах-самцах линии «Вистар» массой 180–210 г., при соблюдении международных правил биоэтики. Острый панкреатит моделировали под эфирным наркозом путём наложения лигатуры на главный проток поджелудочной железы возле места впадения его в 12-перстную кишку, для чего выполняли срединную лапаротомию, выделяли поджелудочную железу и после перевязки протока переднюю брюшную стенку ушивали наглухо. Эвтаназию животных осуществляли под эфирным наркозом через 48 часов после моделирования острого панкреатита. Развитие панкреатита контролировали по морфологическим изменениям поджелудочной железы экспериментальных животных. Клинические исследования проведены у 64 больных, поступивших в отделение хирургии 6 городской больницы г. Симферополя. Все больные нуждались в экстренном хирургическом лечении в связи с перитонитом на фоне острого панкреатита.

В клинике перитонеальный смыв (ПС) собирали в шприц из очага поражения при вскрытии брюшной полости. Полученный перитонеальный секрет гомогенизировали и центрифугировали при 8000 об/мин. Надосадочную жидкость использовали для проведения биохимических исследований. В эксперименте биохимические исследования проводили в перитонеальном смыве (ПС), сыворотке крови и бронхоальвеолярном смыве (БАС). Перитонеальный смыв получали путём пяти-шестикратного промывания брюшной полости 10 мл физиологического раствора. Бронхоальвеолярный смыв получали путём 5–6 кратного промывания лёгких 10 мл физиологического раствора. Активность компонентов протеиназ-

ингибиторной системы определяли энзиматическими методами с использованием специфических субстратов [4]. Трипсиноподобную активность (ТПА) определяли по измерению на спектрофотометре Biomat-5 скорости отщепления N-бензоил-L-аргинина (BA) от синтетического субстрата этилового эфира N- $\alpha$ -бензоил-L-аргинина (BAEE) (Reanal). Определение эластазоподобной активности (ЭПА) проводили спектрофотометрическим методом по гидролизу синтетического субстрата N-t-восаланил-p-нитрофенилового эфира (BANPE). Антитриптическую активность определяли по торможению расщепления трипсином N-бензоил-L-аргинина-p-фенилендиамина (BAPNA) в присутствии сыворотки крови или смывов. Активность альфа-амилазы определяли с использованием крахмального субстрата методом Каравея. Концентрацию белка определяли методом Лоури. Полученные результаты подвергали статистической обработке с использованием критерия Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Проведённые исследования показали, что развитие экспериментального панкреатита сопровождалось характерными изменениями в перитонеальном смыве, свидетельствующими о развитии воспаления в брюшной полости и повреждении поджелудочной железы (табл.1).

**Таблица 1**

Изменения в протеиназ-ингибиторной системе перитонеального смыва крыс при развитии острого панкреатита (M $\pm$ m)

Группа	$\alpha$ -амилаза, г/ч л	ЭПА, мкМ/мл*мин	ТПА, мкМ/мл*мин	АТА, мкМоль/л
Контроль (n=12)	8,18 $\pm$ 0,97	8,92 $\pm$ 1,62	19,5 $\pm$ 1,54	3,17 $\pm$ 0,06
Острый панкреатит (n=14)	10,76 $\pm$ 0,15	17,32 $\pm$ 1,72*	28,3 $\pm$ 2,06*	3,69 $\pm$ 0,07*

*Примечание: звёздочками показана достоверность различий по отношению к контролю: \* – p < 0,05.*

К 48 часам развития острого панкреатита отмечено достоверное увеличение активности  $\alpha$ -амилазы в 1,3 раза относительно контроля. Ещё более существенно, почти в 2 раза, выросла активность эластазоподобных протеиназ. Параллельно увеличивалась почти в полтора раза и трипсиноподобная активность. На фоне роста активности протеолитических ферментов отмечено увеличение антитриптической активности, хотя её повышение не столь значительно и составляет 14 % по отношению к контролю. Описанные местные изменения сопровождались ростом активности протеиназ в сыворотке крови (табл. 2). При этом следует отметить, что в сыворотке реакция  $\alpha$ -амилазы была более выражена, чем в перитонеальном смыве, а значения её активности через 48 часов развития панкреатита превышали контроль в 2,3 раза. В то же время увеличение активности эластазоподобных протеиназ в крови не столь существенно, и их рост по отношению к контролю был отмечен в 1,6 раза. Следует отметить, что практически не выявлен рост трипсиноподобной активности, но антитриптическая активность на этом фоне

снижалась и составила 88 % от уровня контроля.

**Таблица 2**

Изменения в протеиназ-ингибиторной системе крови крыс при развитии острого панкреатита  
(M±m)

Группа	$\alpha$ -амилаза, г/ч л	ЭПА, мкМ/мл*мин	ТПА, мкМ/мл*мин	АТА, мкМоль/л
Контроль (n=12)	97,5±3,41	1,5±0,06	0,24±0,04	39,59±0,91
Острый панкреатит (n=14)	224,32±0,84*	2,4±0,09*	0,27±0,05	34,69±2,28

*Примечание:* звёздочками показана достоверность различий по отношению к контролю: \* –  $p < 0,05$ .

При развитии острого экспериментального панкреатита выявлены характерные изменения местной протеиназ-ингибиторной системы в бронхоальвеолярном секрете, которые проявлялись активацией неспецифических протеиназ. Эластазоподобная активность БАС увеличилась к 48 часам с момента развития острого панкреатита в 1,6 раза по сравнению с контролем. В 1,4 раза выросла активность трипсиноподобных ферментов в БАС. Но в отличие от перитонеального секрета и сыворотки крови, в бронхоальвеолярном секрете существенно увеличилась и антитриптическая активность, значения которой превышали контроль в 1,4 раза.

Таким образом, в проведённом исследовании показано, что при развитии острого экспериментального панкреатита происходит активация протеиназ как местно в перитонеальном секрете, так и системно – на уровне крови, и дистантно – на уровне лёгких. Следует отметить, что более выражено как на местном, так и на системном уровне активируется эластаза. Активация эластазы в перитонеальном секрете превосходит как уровень трипсиноподобных ферментов, так и классического маркера панкреатитов – активность  $\alpha$ -амилазы. Это может свидетельствовать о важной роли активации эластазы в патогенезе панкреатита, где на местном уровне эластаза может являться ведущим ферментом, приводящим к деструкции поджелудочной железы. С другой стороны, незначительное увеличение антитриптической активности в перитонеальном секрете и её снижение в крови свидетельствует о неадекватном контроле со стороны ингибиторов над увеличением активности протеиназ. Адекватное повышение антитриптической активности отмечено только в бронхоальвеолярном секрете, которое, по-видимому, носит компенсаторный характер и является одним из факторов защиты лёгких от системной протеолитической агрессии. Можно предположить, что в случае неадекватного увеличения ингибиторов протеиназ в лёгких могут развиваться воспалительные и деструктивные изменения, приводящие к формированию синдрома острого повреждения лёгких, являющегося обязательным компонентом синдрома полиорганной недостаточности.

В клинической практике, у больных с острым панкреатитом насыщенность перитонеального секрета белком была более чем в 6 раз выше, по сравнению с группой без хирургической патологии. Интересные тенденции отмечены при анализе показателей протеолитической активности. Уровень эластазоподобной активности в перитонеальном секрете был в 5,4 раза выше нормы. Уровень трипсиноподобной активности в перитонеальном смыве у больных острым панкреатитом был в 7 раз выше нормы. Следует отметить, что рост активности протеиназ сопровождался и ростом ингибиторного потенциала. По-видимому, реакция со стороны ингибиторов отражает степень активации протеиназ ингибиторной системы и направлена на противодействие активации протеиназ в перитонеальном секрете. Причем в группе больных с острым панкреатитом антитриптическая активность перитонеального смыва была наиболее высокой и в 18 раз превышала значения антитриптической активности в норме. Таким образом, формирование острого панкреатита проявляется наиболее выраженной активацией протеиназ в перитонеальном секрете. Параллельный рост ингибиторов не в достаточной степени способен компенсировать действие протеиназ, и их активация существенно усиливает риск формирования перитонита и системных осложнений. С одной стороны, это указывает на потенциальную диагностическую ценность определения протеиназ в перитонеальном секрете для оценки степени тяжести и прогноза течения панкреатита и другой абдоминальной патологии. С другой стороны, полученные результаты свидетельствуют о потенциальной эффективности использования местного применения ингибиторов протеиназ при лечении острых панкреатитов и перитонита.

### **Выводы**

В развитии острого экспериментального панкреатита участвуют активные неспецифические протеиназы, что проявляется активацией неспецифических протеиназ как локально в перитонеальном секрете, так и системно в крови и дистантно в бронхоальвеолярном смыве. Уровень изменения активности эластазы в перитонеальном секрете при остром экспериментальном панкреатите превосходит диагностическую ценность определения  $\alpha$ -амилазы – классического маркера панкреатитов. Активация неспецифических протеиназ и потребление их ингибиторов может являться не только важным фактором развития аутолиза поджелудочной железы при остром панкреатите, но и служить важным механизмом формирования органопатологии при панкреатите. В клинической практике, у больных с острым панкреатитом, наиболее выражена местная активация протеиназ и их ингибиторов, что свидетельствует о специфических изменениях в протеиназ-ингибиторной системе и обосновывает потенциальную эффективность местного применения ингибиторов протеиназ в лечебном комплексе при панкреатитах.

## Список литературы

1. Гарипов Р.М. Острый деструктивный панкреатит: иммунологические аспекты в диагностике и лечении / Р.М. Гарипов, З.Р. Гайсина // Вестник Башкортостана. – 2010. – № 4. – С.55-60.
2. Локальные и дистантные реакции неспецифических протеиназ и их ингибиторов при остром экспериментальном панкреатите / О.А. Бугаенко, В.Ю. Михайличенко, Л.В. Анисимова, А.В. Кубышкин // Таврический медико-биологический вестник. – 2014. – № 4. – С.9-13.
3. Имаева А.К. Острый деструктивный панкреатит / А.К. Имаева, Т.И. Мустафин, И.А. Шарифгалиев // Сибирский медицинский журнал. – 2014. – № 8. – С.14-20.
4. Саганов В.П. Острый панкреатит: лабораторные методы диагностики / В.П. Саганов, Г.Д. Гунзынов, В.Е. Хитрихеев, Б.Ц. Цыренович // Вестник Бурятского государственного университета. – 2011. – №12. – С.81-85.
5. Фирсова В.Г. Острый панкреатит: современные аспекты патогенеза и классификации / В.Г. Фирсова, В.В. Паршиков, В.П. Градусов // Современные технологии в медицине. – 2011. – № 2. – С.127-134.

### Рецензенты:

Ильченко Ф.Н., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой хирургии № 2 Медицинской академии имени С.И. Георгиевского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» Министерства образования и науки Российской Федерации, г. Симферополь;

Крутиков Е.С., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой пропедевтики внутренних болезней Медицинской академии имени С.И. Георгиевского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» Министерства образования и науки Российской Федерации, г. Симферополь.