

ФАКТОРЫ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ОСТРОГО ПАНКРЕАТИТА

Власов А.П.¹, Трофимов В.А.¹, Аль-Кубайси Ш.-А.С.¹, Анашкин С.Г.¹, Малахова О.С.¹, Морозова М.М.¹, Муратова Т.А.¹, Васильев В.В.¹, Власова Т.И.¹, Кузьмин А.Н.¹

¹ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва», Саранск, e-mail: vap.61@yandex.ru

Проведено клиническое исследование 150 пациентов с острым панкреатитом, разделенных на 3 группы: I группа (n=50) – больные острым панкреатитом легкой степени тяжести; II группа (n=50) – средней степени тяжести; III группа (n=50) – тяжелой степени. В IV группу вошли здоровые лица (n=20). Стандартизированная комплексная терапия проводилась согласно современным клиническим рекомендациям. В работе представлены данные оценки состояния микроциркуляции с использованием методики доплеровской флоуметрии, перекисного окисления липидов по содержанию малонового диальдегида в плазме крови в реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой, диеновых конъюгатов спектрофотометрическим методом, активности фосфолипазы A2 титриметрическим методом, генетической диагностики. Отмечено, что уже в ранние сроки острого панкреатита наблюдается существенное нарушение микроциркуляции, которое более выражено при тяжелой форме болезни. Установлено, что отмеченные отклонения сопровождаются полиморфизмом гена NOS3 (C774T), участвующего в патогенезе эндотелиальной дисфункции, от которого во многом зависит состояние микроциркуляции. Показано, что в патогенезе последней у больных острым панкреатитом большое значение имеет чрезмерная активность оксидативных процессов и фосфолипаз, принимающих участие в формировании явлений дестабилизации клеточных мембран, в том числе со стороны эндотелиальных клеток.

Ключевые слова: острый панкреатит, микроциркуляция, оксидативный стресс, полиморфизм C774T, eNOS.

RISK FACTORS OF PROGRESSION OF ACUTE PANCREATITIS

Vlasov A.P.¹, Trofimov V.A.¹, Al-Kubaisi Sh-A. S.¹, Anashkin S.G.¹, Malakhova O.S.¹, Morozova M.M.¹, Muratova T.A.¹, Vasiliev V.V.¹, Vlasova T.I.¹, Kuzmin A.N.¹

¹Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, e-mail: vap.61@yandex.ru

We've done a clinical study of 150 patients with acute pancreatitis, whom are divided into 3 groups: group I (n = 50) - patients with mild pancreatitis; II group (n = 50) - patients with moderate pancreatitis; III group (n = 50) - patients with severe pancreatitis, both sexes and in age 21-55 years. Healthy individuals were examined like control (n = 20). The studied patients were cared by standardized complex therapy according to clinical recommendations. The paper presents data on the evaluation of the state of microcirculation using the technique of Doppler flowmetry, lipid peroxidation by the content of malonic dialdehyde in blood plasma in reaction with 2-thiobarbituric acid, diene conjugates by spectrophotometric method, activity of phospholipase A2 by the titration method, genetic diagnosis. It was proved that there is a significant violation of microcirculation in the early stages of acute pancreatitis, which is more pronounced in severe form of the disease. It was also revealed that these abnormalities are accompanied by C774T polymorphism of the NOS3 genes, which is involved in the pathogenesis of endothelial dysfunction, on which the microcirculation condition largely de-pends. It is shown that in the pathogenesis of the latter in patients with acute pancreatitis, the excessive activity of oxidative processes and phospholipases, which take part in the formation of destabilization phenomena of cell membranes, including from the side of endothelial cells, is important.

Keywords: acute pancreatitis, disturbance of microcirculation, lipid oxidation, polymorphism C774T, eNOS.

Острый панкреатит (ОП) является одним из наиболее частых хирургических заболеваний. На его долю приходится более 10% ургентной патологии органов брюшной полости. Частота ОП во всем мире составляет от 4,9 до 73,4 случаев на 100 000 человек. При этом летальность при ОП остается высокой (10–20%), что объясняется отсутствием специфических диагностических и терапевтических методов [1].

Показано, что при ОП активируются как клеточные, так и гуморальные факторы системы комплемента, система гемостаза и калликреин-кининовая система, вызывая освобождение оксида азота (NOS). NOS в свою очередь усиливает перекисное окисление мембранных липидов различных клеток, повышает проницаемость микроциркуляторного русла, вызывает ишемию органов, стимулирует апоптоз клеток эндотелия [2]. По данным генетического исследования показано, что при деструкции NOS3 активизируются факторы, ассоциированные с повреждением железы, в частности повышается активность интрапанкреатического трипсина. При селективном разрушении NOS3 в начальной фазе острого индуцированного панкреатита отмечено повышение активности панкреатического трипсина и сывороточной липазы. Показано, что оксид азота, индуцированный эндотелиальной NO-синтазой, оказывает протективный эффект через активацию, вероятнее всего, эндотелиальных клеток, что способствует лучшему интрапанкреатическому кровотоку [3].

Наиболее патогенетически значимые изменения острого панкреатита происходят на уровне микроциркуляторного русла. Им свойственны замедление линейной скорости кровотока, агрегация и застой сформированных элементов крови, повышенная проницаемость сосудов. Микроциркуляторные расстройства, являющиеся генерализованными, имеют определенную стадийность и обычно детерминированы формой панкреатита и тяжестью деструктивных изменений в поджелудочной железе. Значительные нарушения микроциркуляции, приводящие к гипоксии тканей и извращению тканевого метаболизма, являются одной из причин прогрессирования заболевания и развития полиорганной недостаточности [4].

Цель исследования. Определить роль нарушений микроциркуляции и процессов, определяющих структурно-функциональное состояние микроциркуляторного русла, в прогрессировании острого панкреатита.

Материал и методы исследования. В настоящее исследование включены 150 пациентов ОП различной степени тяжести и 20 здоровых лиц. Получено добровольное информированное согласие об участии в исследовании. Пациенты были рандомизированы по полу, возрасту, выраженности заболевания и разделены на 3 группы: I группа (n=50) – легкой степени тяжести; II группа (n=50) – средней степени тяжести; III группа (n=50) – тяжелой степени. Больные были обоего пола в возрасте 21–55 лет. Пациентам проводилась комплексная стандартизированная терапия, включающая антиферментный, инфузионный, антибактериальный, обезболивающий, спазмолитический компоненты. Следует отметить, что у 12 (24,0%) больных тяжелым ОП потребовалось проведение и хирургических вмешательств.

Оценка состояния микроциркуляции проводилась с помощью аппарата ЛАКК-02 (НПП «Лазма», Россия) с соблюдением базовых требований методики доплеровской флоуметрии. В качестве точки для оценки параметров состояния сосудов микроциркуляторного русла была использована точка Захарьина–Геда.

Геномная ДНК выделялась из периферической венозной крови с помощью наборов DNA-Extran-1 при использовании протокола производителя (ЗАО «Синтол», Москва). Исследуемые локусы генов анализировали с помощью амплификации (полимеразно-цепной реакции). Для этого использовали CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, United States).

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) было определено по уровню в плазме крови малонового диальдегида (МДА) в реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Содержание диеновых конъюгатов (ДК) установлено спектрофотометрическим методом. Определение активности фосфолипазы А2 произведено титрометрическим методом (Ганстон Ф.Д., 1986).

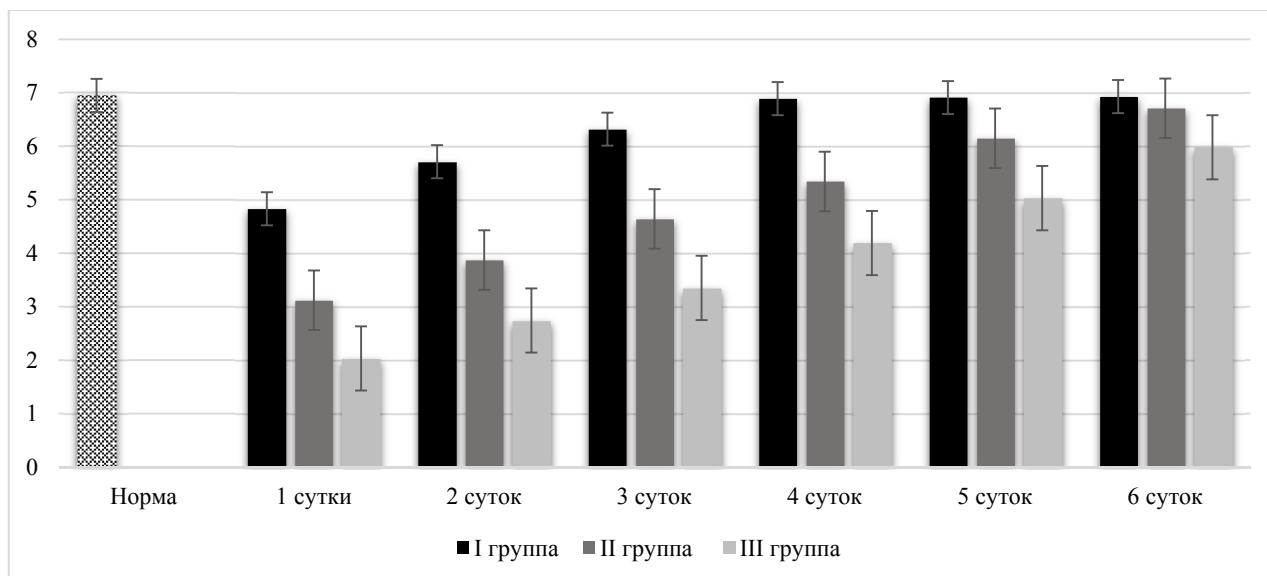
Статистическая обработка данных результатов было выполнена с помощью программы Statistica 7,0. и калькулятора для расчета статистики в исследованиях «случай – контроль». Для сравнения разных групп пациентов с острым панкреатитом и определения их статистической значимости различий средних величин использовали t-критерий Стьюдента. С целью оценки соответствия наблюдаемого распределения ожидаемому, исходя из равновесия Харди–Вайнберга. Установление ассоциации генетического полиморфизма с предрасположенным фенотипом, характеризующим степени тяжести развития острого панкреатита, было выполнено с помощью расчета величины отношения шансов (OR). Соотношение фактических частот генотипов к теоретически ожидаемым определяли по критерию χ^2 .

Результаты исследования и их обсуждение. При госпитализации больных в клинику диагноз «острый панкреатит» подтвержден с помощью клинических, лабораторных и инструментальных методов обследования. Оценка степени тяжести острого панкреатита проведена по шкале APACHE II. Оказалось, что при рассмотрении признаков заболевания сумма баллов у пациентов I группы составила $3,205 \pm 0,081$, во II группе – $8,724 \pm 0,359$, а у лиц III группы – $14,994 \pm 1,276$. Известно, что, если сумма превышает 10 баллов, развитие панкреатита носит преимущественно деструктивный характер [5].

Нами установлено, что ранний период больных острым панкреатитом сопровождался существенными микроциркуляторными нарушениями. Об этом свидетельствовали изменения фактически всех исследованных показателей микроциркуляции.

При исследовании микроциркуляции установлено, что уровень параметра М (характеризующий увеличение или снижение перфузии) у пациентов группы I в первые 2

суток был ниже нормы – на 31,44% и 17,24% ($p < 0,05$) соответственно. К 3-м суткам показатель М значительно повысился, но оставался ниже нормы на 8,4% ($p < 0,05$). На 4-е, 5-е и 6-е сутки исследования показатель М был в пределах нормы ($p > 0,05$). Параметр М у исследуемых пациентов ОП средней степени тяжести было ниже значения нормы в первые 4 суток на 54,78%, 43,91%, 32,75% и 22,6 ($p < 0,05$) соответственно. К 5-м суткам показатель М заметно повысился, но при этом сохранялся ниже нормы на 10,86% ($p < 0,05$). На 6-е сутки уровень М соответствовал норме. Содержание параметра М у больных группы III на всех сроках исследования было ниже нормы на 60,28–13,3% ($p < 0,05$) (рис. 1).



*Рис. 1. Динамика показателя М в плазме крови больных острым панкреатитом разной степени тяжести. Здесь и далее в рисунках: I – пациенты с легким острым панкреатитом, II – пациенты с острым панкреатитом средней степени тяжести, III – пациенты с тяжелым острым панкреатитом; * – достоверность отличия от установленной нормы при $p < 0,05$*

Показано, что значение параметра К_v (коэффициент вариации) у пациентов группы I было ниже нормы в 1-е сутки на 10,92%. Ко 2-м и 3-м суткам исследования показатель К_v заметно повышался, но оставался ниже значений нормы на 6,05% и 3,22% ($p < 0,05$) соответственно. На 4-е, 5-е и 6-е сутки уровень К_v приближался к норме ($p > 0,05$). У пациентов группы II параметр К_v гемостазиограммы в первые 3 суток был ниже нормы на 31,84%, 26,64% и 18,75% соответственно. К 4-м и 5-м суткам показатель К_v повышался, но оставался ниже нормы на 11,1% и 4,93% ($p < 0,05$). На 6-е сутки исследования параметр К_v был в пределах нормальных величин. У пациентов III группы параметр К_v в первые 5 суток было ниже нормы на 48,02%, 40,41%, 33,15%, 27,43% и 19,01% соответственно. К 6-м суткам уровень параметра К_v увеличивался, но оставался ниже нормы на 9,01% ($p < 0,05$).

Проведенные исследования выявили, что значение показателя σ (среднеквадратичное отклонение, которое характеризует статистически значимые колебания скорости эритроцитов) у лиц группы I в первые 2 суток был ниже нормы на 12,5% и 6,25% ($p < 0,05$). На 3-и, 4-е, 5-е и 6-е сутки наблюдения параметр σ был в пределах нормы ($p > 0,05$). Значение показателя σ у пациентов группы II в первые 2 суток было ниже нормы на 30,0% и 21,25% ($p < 0,05$). На 3-и сутки исследования значение параметра σ увеличилось, но оставалось ниже нормального уровня на 8,75% ($p < 0,05$). К 4-м, 5-м и 6-м суткам исследования параметр σ приближался к значениям нормы. У пациентов группы III показатель σ в первые 5 суток был ниже нормы на 56,25%, 47,5%, 36,25%, 26,25% и 22,5% ($p < 0,05$) соответственно. К 6-м суткам наблюдения за больными параметр σ вырос и вплотную приближался к норме.

При проведении генетического исследования частот аллелей и генотипов полиморфизма синтазы оксида азота у пациентов с острым панкреатитом разных форм и здоровых лиц получили следующие результаты (табл. 1).

Таблица 1

Распределение полиморфизма *eNOS* (C774T) у больных с острым панкреатитом разной степени тяжести и здоровых лиц

Исследуемые группы		Генотип и его частота					Аллель и его частота			
		CC	n (%)	CT	n (%)	TT	n (%)	C	n (%)	T
Норма (n=45)	n %	28 (62,2%)	14 (31,1%)	3 (6,6%)	35 (77,8%)	10 (22,2%)				
Легкий ОП (n=50)	n %	24 (48,0%)	19 (38,0%)	7 (14,0%)	33,5 (67,0%)	16,5 (33,0%)				
ОП средней степени тяжести (n=50)	n %	16 (32,0%)	25 (50,0%)	9 (18,0%)	28,5 (57,0%)	21,5 (43,0%)				
Тяжелый ОП (n=50)	n %	15 (30,0%)	23 (46,0%)	12 (24,0%)	26,5 (53,0%)	23,5 (47,0%)				

Частоты генотипов C/C, C/T и T/T в выборке обследованных доноров составили 62,2%, 31,1% и 6,6% соответственно. У больных легким ОП частоты генотипов C/C, C/T и T/T составили 48,0%, 38,0% и 14,0%. У больных ОП средней степени тяжести частоты генотипов C/C, C/T и T/T составили 32,0%, 50,0% и 18,0%, а с тяжелым ОП – 30,0%, 46,0% и 24,0% (табл. 1).

Таблица 2

Распределение полиморфизма *eNOS* (C774T) у больных острым панкреатитом средней степени тяжести и здоровых лиц

Генотипы	Случаи	Норма	χ^2	p	OR	
	n=50	n=45			знач.	95% CI

Генотип <i>C/C</i>	0,320	0,622	9,14	0,01	0,29	0,12–0,67
Генотип <i>C/T</i>	0,500	0,311			2,21	0,96–5,13
Генотип <i>T/T</i>	0,180	0,067			3,07	0,78–12,16
Аллель <i>C</i>	0,570	0,778	9,23	0,002	0,38	0,20–0,71
Аллель <i>T</i>	0,430	0,222			2,64	1,40–4,98

В выборке больных ОП средней степени тяжести частоты аллелей *C* и *T* достоверно отличаются от частот соответствующих аллелей у доноров ($\chi^2 = 9,14$, $p = 0,01$). Также выявлена ассоциация аллеля *T* с риском развития панкреонекроза (OR=2,64, 95% CI (1,4–4,98)) (табл. 2). При этом отмечается ассоциация генотипов *C/T* и *T/T* у пациентов с ОП средней степени тяжести с развитием тромбоза панкреатических сосудов и нарушением микроциркуляции поджелудочной железы, что утяжеляет течение заболевания и способствует развитию осложнений ($(\chi^2 - 9,14, p - 0,01)$, (OR = 2,21, 95% CI (0,96 – 5,13)) и (OR = 3,07, 95% CI (0,78 – 12,16))) соответственно (табл. 2).

Таблица 3

Распределение полиморфизма *eNOS (C774T)* у пациентов острым тяжелым панкреатитом и здоровых лиц

Генотипы	Случаи	Норма	χ^2	p	OR	
	n=50	n=45			знач.	95% CI
Генотип <i>C/C</i>	0,300	0,622	11,29	0,004	0,26	0,11–0,61
Генотип <i>C/T</i>	0,460	0,311			1,89	0,81–4,37
Генотип <i>T/T</i>	0,240	0,067			4,42	1,16–16,87
Аллель <i>C</i>	0,530	0,778	12,74	0,0004	0,32	0,17–0,61
Аллель <i>T</i>	0,470	0,222			3,10	1,65–5,85

При распределении пациентов с тяжелым ОП выявлено, что аллель *T* ассоциирован с повышением риска нарушения микроциркуляции и развитием тромбоза ($(\chi^2 - 12,74, p - 0,0004)$, (OR = 3,1, 95% CI (1,65 – 5,85))). При изучении генотипов *C/T* и *T/T*, доказано, что они ассоциированы с расстройством микроциркуляции и развитием тромбоза ($(\chi^2 - 11,29, p - 0,004)$, (OR = 1,89, 95% CI (0,81 – 4,37)) и (OR = 4,42, 95% CI (1,16 – 16,87))) соответственно (табл. 3).

При изучении процессов ПОЛ выявлено, что содержание ДК в плазме крови у пациентов группы I было повышено в первые 4 суток наблюдения на 95,23%, 61,9%, 33,3% и 4,76% ($p < 0,05$). Установлено, что уровень ДК к 5-м и 6-м суткам был в пределах нормы. У больных группы II концентрация ДК была выше нормы в первые 4 суток на 123,8%, 90,47%, 66,6%, 47,61% ($p < 0,05$) соответственно. На 5-е сутки наблюдения показатель ДК уменьшался, но оставался выше нормы на 14,28% ($p < 0,05$). Этот же показатель к последним суткам был в пределах нормы. Уровень ДК у пациентов группы с

острым тяжелым панкреатитом достоверно превышал значения нормы на всех сроках исследования на 142,85%, 128,57%, 114,28%, 85,71%, 61,9% и 38,09% ($p < 0,05$) соответственно.

При проведении исследования оказалось, что показатель МДА (ТБК-активные продукты) у больных острым панкреатитом легкой формы достоверно увеличивался в первые 4 суток наблюдения на 81,81%, 63,6%, 27,2% и 13,63% ($p < 0,05$) соответственно, а к 5-м и 6-м суткам был в пределах нормы. Содержание ТБК-активных продуктов у лиц группы II было выше значений нормы в первые 3 суток на 115,0%, 85,0% и 65,5% ($p < 0,05$) соответственно. На 4-е и 5-е сутки исследования содержание ТБК-активных продуктов было ниже первоначального, но выше нормы на 45,0% и 15,0% ($p < 0,05$). При этом к 6-м суткам показатель вплотную приближался к норме. У пациентов группы III концентрация ТБК-активных продуктов достоверно превышала значения группы нормы на всех этапах периода исследования на 145,0%, 120,0%, 90,0%, 60,0%, 45,0% и 25,0% соответственно.

При легкой степени тяжести ОП (I группа) активность фосфолипазы А2 (ФЛ А2) у исследуемых лиц существенно изменялась. Так, на 1-е и 2-е сутки стандартного лечения активность ФЛ А2 была выше нормы на 221,1% и 144,4% ($p < 0,05$). В последующие сутки (3-е и 4-е) наблюдалось заметное снижение активности фермента, однако значение оставалось выше нормы на 88,8% и 33,3% ($p < 0,05$) (рис. 2). К последующим суткам наблюдения активность ФЛ А2 была в пределах значений нормы. Динамика показателя ФЛ А2 у пациентов ОП средней степени тяжести (II группа) была следующей. Отмечено достоверное ее повышение в течение первых 4 суток на 336,6%, 228,8%, 177,7% и 77,7% ($p < 0,05$) соответственно. На 5-е сутки активность ФЛ А2 значительно снижалась, но оказалась выше нормы на 33,3% ($p < 0,05$). На 6-е сутки показатель ФЛ А2 соответствовал норме ($p > 0,05$). У пациентов с острым тяжелым панкреатитом (III группа) активность ФЛ А2 в периоды наблюдения была повышена на 466,6%, 377,7%, 277,7%, 211,1%, 166,6% ($p < 0,05$) соответственно. На 6-е сутки активность ФЛ А2 снижалась, но оставалась выше значений нормы на 55,5% ($p < 0,05$) (табл. 5) (рис. 2).

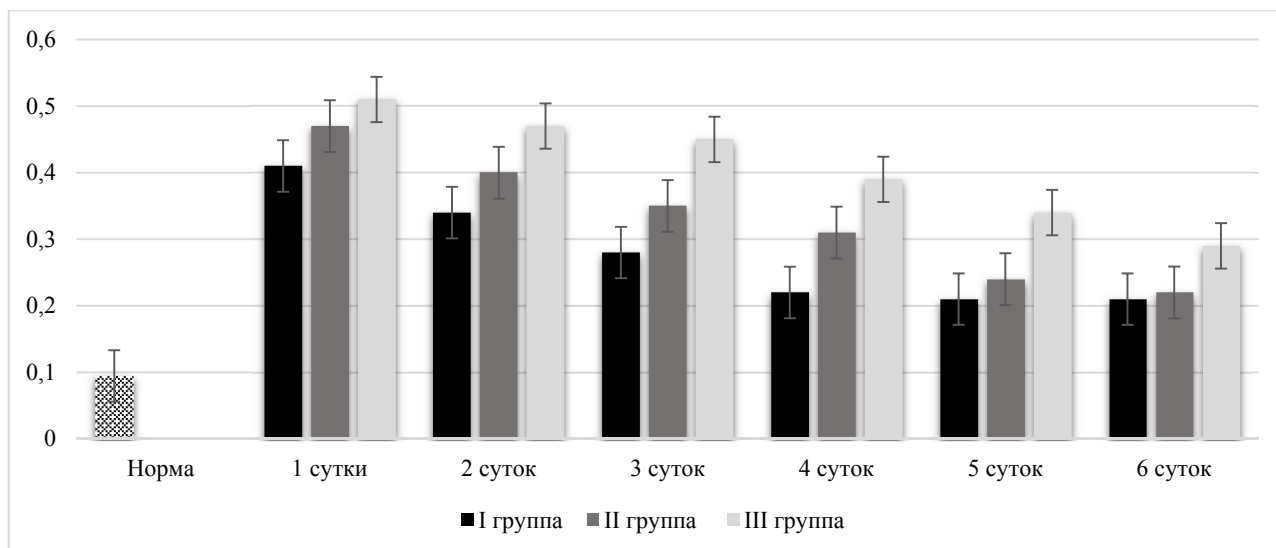


Рис. 2. Динамика активности фосфолипазы A2 в плазме крови больных острым панкреатитом разной степени тяжести

Подчеркнем, что у 12 больных острым тяжелым панкреатитом в ранние сроки наблюдения не происходило существенного улучшения микроциркуляции и уменьшения активности липопероксидации и фосфолипаз. У этих пациентов регистрировалось прогрессирующее заболевание, что потребовало хирургических вмешательств.

Выводы. Таким образом, анализ полученных данных свидетельствует о том, что по мере утяжеления острого панкреатита отмечается ухудшение микроциркуляции. Указанный патофизиологический процесс сопряжен с активизацией оксидативного стресса. Особенно выраженными указанные расстройства были у больных при тяжелой форме болезни, что, безусловно, повышает риск микротромбообразования.

Установлено, что отмеченные микроциркуляторные отклонения сопровождаются полиморфизмом генов NOS3 и C774T, которые участвуют в патогенезе эндотелиальной дисфункции, от которой во многом зависит состояние микроциркуляции. Полученные данные дают основание утверждать, что в патогенезе последней у больных ОП большое значение имеет чрезмерная активность перекисного окисления мембранных липидов и фосфолипаз, приводящая к мембранодестабилизирующим явлениям, в том числе со стороны эндотелиальных клеток.

Отмечено, что указанный спектр расстройств сопряжен с прогрессирующим структурно-функциональным нарушением со стороны тканей поджелудочной железы, что диагностировано по данным УЗ-исследований и компьютерной томографии. У этой группы больных стандартизированная консервативная терапия оказалась не всегда эффективной. У 12 (24%) пациентов потребовалось проведение хирургических вмешательств: на первом этапе в большинстве лапароскопическое санирование и дренирование брюшной полости,

далее по показаниям – дренирование жидкостных парапанкреатических и параколических образований.

Список литературы

1. Острый панкреатит // Абдоминальная хирургия. Национальное руководство: краткое издание / под ред. И.И. Затевахин, А.И. Кириенко, В.А. Кубышкин. М.: ГЭОТАР–Медиа, 2016. С.716–734.
2. Рахимов Б.М., Галкин И.В., Симатов А.М, Колесников В.В., Шерстнев И.А., Снопов С.А., Матвиенко В.А Лечение острого тяжелого // Материалы пленума правл. ассоциации гепатопанкреатобилиарных хирургов стран СНГ. Самара, 2015. С.120– 121.
3. Ye-Chen Feng, Min Wang, Feng Zhu, Ren-Yi Qin. Study on acute recent stage pancreatitis. World. J. Gastroenterol. 2014. Nov. 21. Vol.20(43). P.16138–16145.
4. Тимербулатов М.В., Сендерович Е.И., Зиганшин Т.М., Рахимов Р.Р. Многоступенчатый подход в лечении некротического панкреатита // Вопросы передачи опыта и освоения новых технологий в малоинвазивной хирургии: материалы XIX Съезда Общества эндоскопических хирургов России (РОЭХ) (Москва, 16-18 февраля 2016 г.). М., 2016. С.105-106.
5. Aranda-Narváez JM, González-Sánchez AJ, Montiel-Casado MC, Titos-García A, Santoyo-Santoyo J. Acute necrotizing pancreatitis: Surgical indications and technical procedures. World. J. Clin. Cases. 2014. Vol. 2(12). P. 840–845.