

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

**Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
Кафедра біохімії та біотехнології**

**БІОХІМІЧНІ МАРКЕРИ ДИФЕРЕНЦІЙНОЇ ДІАГНОСТИКИ БІЛІАРНОГО
ТА НЕБІЛІАРНОГО ГОСТРОГО ПАНКРЕАТИТУ**

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Виконала:

студентка 6 курсу, 611 М групи

Караушу Даяна Миколіївна

Керівник:

к.б.н., доцент Кеца О. В.

До захисту допущено:

Протокол засідання кафедри

протокол № ____ від „____” _____ 2024 р.

зав. кафедри _____ проф. Копильчук Г. П.

Чернівці–2024

АНОТАЦІЯ

Магістерська робота присвячена вивченню біохімічних маркерів функціонального стану підшлункової залози (α -амілази, ліпази, трипсину), маркерів функціонального стану гепатобіліарної системи (ензимних активностей аланінамінотрансферази (АЛТ), лужної фосфатази (ЛФ), γ -глутамілтрансферази (ГГТ), вмісту загального білірубіну та маркера системної запальної відповіді (вмісту С-реактивного протеїну (СРП)) у плазмі крові хворих з небіліарним на біліарним гострим панкреатитом (ГП).

Встановлено, що перебіг ГП супроводжується підвищенням в плазмі крові ензимних активностей α -амілази, ліпази та трипсину. Порівняльний аналіз цих показників при біліарній та небіліарній формі ГП показав достовірне підвищення лише амілазної активності при біліарному ГП порівняно з небіліарним. При розвитку білірного ГП у плазмі крові підвищуються ензимні активності АЛТ та ЛФ порівняно з показниками характерними для небіліарного ГП. γ -Глутамілтрансферазна активність та вміст загального білірубіну однаковою мірою підвищуються при небіліарному та біліарному ГП.

Показано, що підвищення вмісту СРП відбувається однаковою мірою як при небіліарному ГП, так і при біліарному ГП, що вказує на розвиток запальних процесів в тканинах підшлункової залози. Проте цей показник не дозволяє диференційно діагностувати небіліарну та біліарну форми ГП.

Ключові слова: α -амілаза, ліпаза, трипсин, аланінамінотрансфераза, лужна фосфатаза, γ -глутамілтрансфераза, загальний білірубін.

Кваліфікаційна робота містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів наукових досліджень інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Д. М. Караушу

ABSTRACT

The master's thesis is devoted to the study of biochemical markers of the functional state of the pancreas (α -amylase, lipase, trypsin), markers of the functional state of the hepatobiliary system (enzyme activities of alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), γ -glutamyltransferase (GGT), the content of total bilirubin and a marker of the systemic inflammatory response (the content of C-reactive protein (CRP)) in the blood plasma of patients with non-biliary and biliary acute pancreatitis (AP).

It was established that the course of AP is accompanied by an increase in the blood plasma enzymatic activities of α -amylase, lipase and trypsin. A comparative analysis of these indicators in biliary and non-biliary forms of AP showed a significant increase only in amylase activity in biliary AP compared to non-biliary. With the development of biliary HP, the enzymatic activities of ALT and LF in blood plasma increase compared to the indicators characteristic of non-biliary HP. γ -Glutamyltransferase activity and total bilirubin content increase to the same extent in non-biliary and biliary HP.

It has been shown that the increase in the content of CRP occurs to the same extent in both non-biliary HP and biliary HP, which indicates the development of inflammatory processes in the tissues of the pancreas. However, this indicator does not allow for the differential diagnosis of non-biliary and biliary forms of HP.

Keywords: α -amylase, lipase, trypsin, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, γ -glutamyltransferase, total bilirubin.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ ТА ПОЗНАЧЕНЬ	5
ВСТУП	6
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1. Патофізіологічні аспекти розвитку гострого панкреатиту	8
1.2. Біомаркери у встановленні діагнозу гострого панкреатиту	12
1.3. Роль біохімічних та імунологічних показників у прогнозуванні тяжкого гострого панкреатиту	16
1.4. Маркери порушення гепатобіліарної системи як потенційні біомаркери для прогнозування тяжкості біліарного гострого панкреатиту	19
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	25
2.1. Об'єкт та методи досліджень	25
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	34
ВИСНОВКИ	45
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	46
ДОДАТКИ	52

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ ТА ПОЗНАЧЕНЬ

АЛТ – аланінамінотрансфераза

ГГТ – γ -глутамілтрансфераза

ГП – гострий панкреатит

ЛФ – лужна фосфатаза

СРП – С-реактивний протеїн

ВСТУП

Гострий панкреатит (ГП) – запальне захворювання підшлункової залози, яке у 80% пацієнтів має легкий перебіг і проходить без серйозних ускладнень. У 20% пацієнтів спостерігаються ускладнення та значна смертність [1]. Етіологія та патогенез ГП інтенсивно досліджуються, проте питання особливостей ранньої діагностики цієї патології залишаються відкритими.

ГП – потенційно небезпечне для життя захворювання, спектр тяжкості якого коливається від легкого самообмежувального захворювання до дуже летального тяжкого некротичного панкреатиту. Хоча про точний патогенез мало відомо, широко визнано, що передчасна активація травних ферментів у ацинарних клітинах підшлункової залози є тригером, який призводить до самоперетравлення тканини підшлункової залози, що супроводжується інфільтрацією та активацією лейкоцитів [2]. Протягом останніх кількох десятиліть було проведено широкі дослідження щодо їх ролі в діагностиці та прогностичній оцінці тяжкого гострого панкреатиту. Хоча для ранньої оцінки тяжкості було вивчено багато окремих біохімічних маркерів, але все ще не зрозуміло, які з них є специфічними для різних видів ГП [3].

Відкрито багато причин розвитку ГП, але патогенетичні теорії суперечливі. Найпоширенішою причиною ГП вважається ураження дистального відділу загальної жовчно-підшлункової протоки. Тому, одним з найчастіших етіологічних факторів розвитку ГП є зміни в гепатобіліарній системі [4]. Відомо, що рефлюкс жовчі в загальну панкреатичну протоку може викликати ГП. До розвитку ГП також може призвести міграція жовчного каменю в загальну жовчну протоку. Ці етіологічні фактори дозволяють виділити біліарну форму ГП, диференційна діагностика якого залишається мало вивченою. Тому, вивчення різних біохімічних маркерів у діагностиці та оцінці тяжкості біліарного та небіліарного видів ГП є досить актуальним.

Одними із маркерів диференційної діагностики біліарного ГП можуть бути показники функціонального стану печінки (ензимні активності аланінамінотрансферази (АЛТ), γ -глутамілтрансферази (ГГТ), лужної фосфатази (ЛФ), рівня загального, прямого та непрямого білірубінів) та маркери функціонального стану підшлункової залози (ензимні активності панкреатичної еластази, α -амілази, ліпази, трипсину). Окрім того, значну роль у диференційній діагностиці біліарного та небіліарного ГП відіграють імунологічні показники та показники гострої фази запалення [5].

Враховуючи вище вказане, метою роботи було оцінити роль біохімічних маркерів у диференційній діагностиці біліарного та небіліарного гострого панкреатиту.

У зв'язку з цим поставлені наступні **завдання**:

1. Дослідити ензимні активності маркерів функціонального стану підшлункової залози – α -амілази, ліпази та трипсину в плазмі крові хвори за умов розвитку біліарного та небіліарного ГП.
2. Визначити ензимні активності АЛТ, ЛФ, ГГТ та вміст загального білірубіну у плазмі крові хворих як маркерів стану гепатобіліарної системи за умов розвитку біліарного та небіліарного ГП.
3. Визначити вміст протеїну гострої фази запалення – СРП у плазмі крові хворих за умов розвитку біліарного та небіліарного ГП.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Патофізіологічні аспекти розвитку гострого панкреатиту

Незважаючи на інтенсивні дослідження протягом десятиліть, точний патогенез ГП залишається мало вивченим. Розрізняють різні теорії патогенезу ГП: теорія загального шляху біліопанкреатичної протоки, теорія самоперетравлення підшлункової залози, теорія міграції каменів у жовчному міхурі, теорія активації ферментів, теорія активації кініну та комплементу, теорія порушення мікроциркуляції та теорія апоптозу та некрозу ацинарних клітин підшлункової залози. Аналіз цих теорій показує, що усі вони є суперечливими і можуть лише пояснити певні аспекти патогенезу або підібрати хворобу внаслідок певної етіології [6].

Найбільшою перешкодою у вивченні патогенезу ГП є його швидкий перебіг і відносна недоступність тканини підшлункової залози. Щоб подолати цю проблему, дослідники зараз звернулися до моделей тварин для вивчення молекулярних аспектів патогенезу ГП. Ще більше ускладнюють питання парадоксальні результати щодо патогенезу, отримані від різних тварин, які зазнали подібної етіології [7].

Найбільш прийнятною теорією патогенезу ГП є передчасна активація трипсину в паренхімі підшлункової залози, що діє як центральний крок у ініціації самоперетравлення тканини підшлункової залози та подальшого локального та системного запалення [2]. Незалежно від того, що було початковою подією, прогресування захворювання можна розглядати як трифазний континуум [8]:

- 1 етап – локальне запалення підшлункової залози;
- 2 етап – генералізована запальна реакція;
- 3 етап – кінцева стадія поліорганної дисфункції.

Під час розвитку ГП відбувається пошкодження ацинарних клітин, що призводить до активації трипсину після порушення обміну через клітинну мембрану з подальшою активацією каскаду зимогену трипсином. Залучення та активація лейкоцитів відбувається з вивільненням багатьох прозапальних і

протизапальних цитокінів, а також хемокінів [9]. Явна та тривала активація прозапальних медіаторів призводить до синдрому системної запальної відповіді (ССЗВ), який у подальшому може призвести до поліорганної недостатності та інфікування панкреонекрозу та сепсису з пізніми ускладненнями гострого панкреатиту (рис. 1.1) [4].

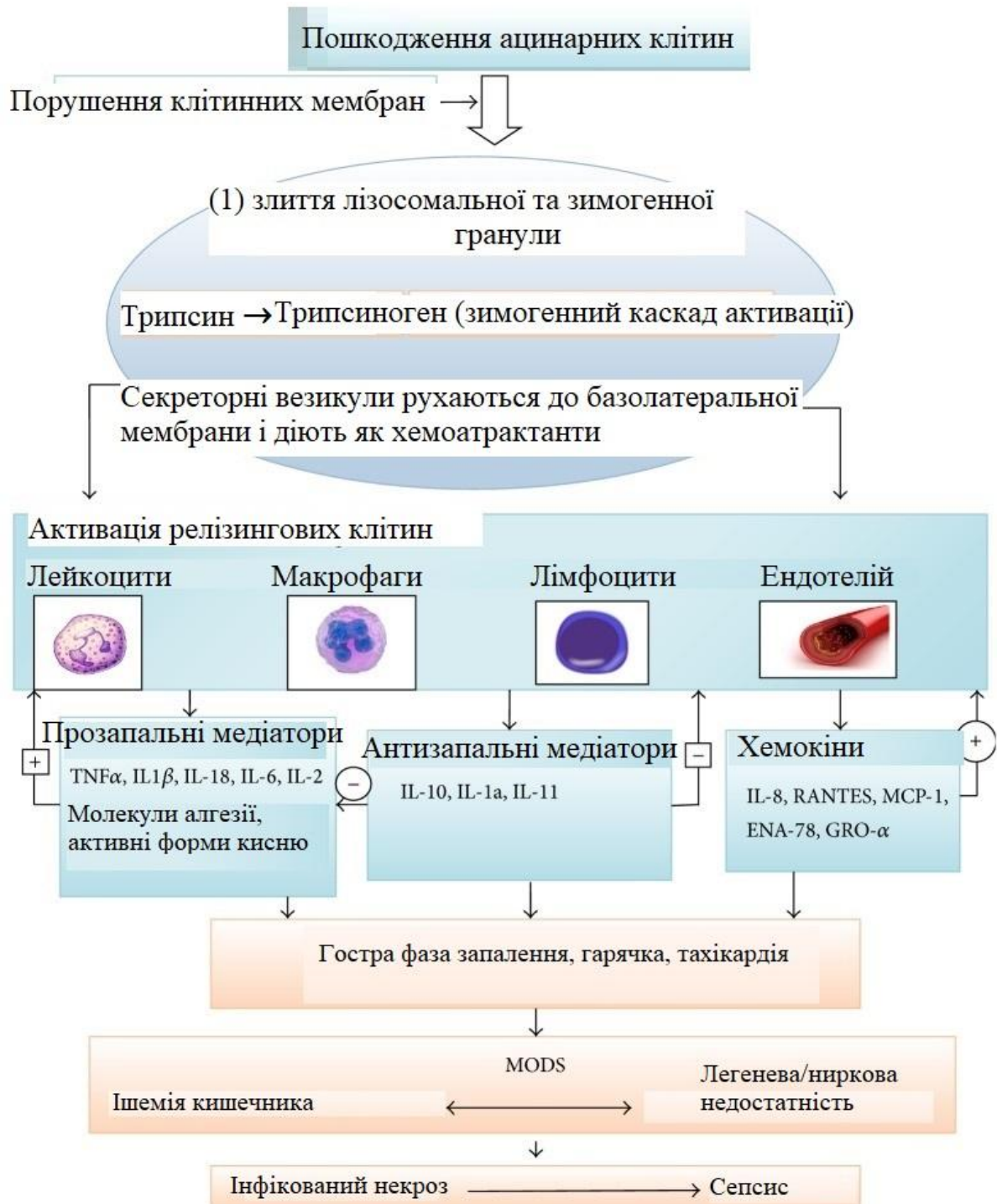


Рис.1.1. Схема патогенезу гострого панкреатиту

На ранній стадії ГП запалення зазвичай локалізується в підшлунковій залозі, що клінічно проявляється як легкий ГП. Зазвичай це проходить протягом тижня без будь-яких місцевих чи системних ускладнень [8]. Однак, якщо хвороба прогресує, виникає фаза генералізованого запалення. Згодом виникає фаза змішаної запальної відповіді, відомої як синдром змішаної антагоністичної відповіді (СЗАВ), яка клінічно проявляється ГП середнього ступеня тяжкості, пов'язаним із транзиторною органною недостатністю та місцевими ускладненнями [10].

В кінці настає фаза пригніченої запальної відповіді, яка відома як синдром компенсаторної відповіді (СКВ), який проявляється як тяжкий ГП, пов'язаний зі стійкою органною недостатністю. Імунна система на цій фазі знижується, що призводить до більшої сприйнятливості підшлункової та навколопанкреатичної тканини до інфекції бактеріями, що переміщуються з кишечника. Наступний сепсис і поліорганна недостатність є основною причиною пізньої захворюваності та смертності при тяжкому гострому панкреатиті. Тяжкий гострий панкреатит перебігає у дві фази, які мають різну тривалість (рис.1.2) [11].

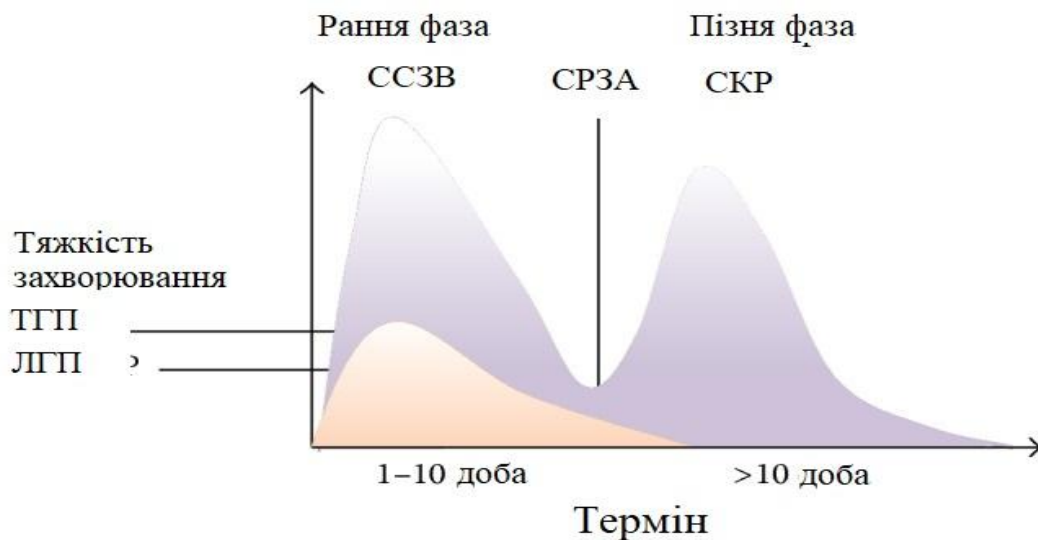


Рис.1.2. Фази розвитку тяжкого гострого панкреатиту

Примітка: ТГП – тяжкий гострий панкреатит; ЛГП – легкий гострий панкреатит; СКР – синдром компенсаторної реакції; СРЗА – синдром реакції змішаного антагоніста; ССЗВ – синдром системної запальної відповіді.

Аналіз літературних джерел показав, що етіологія і патогенез ГП сьогодні інтенсивно досліджуються. Більшість дослідників визнають, що основними факторами гострого біліарного панкреатиту є гіперстимуляція підшлункової залози та обструкція жовчно-панкреатичної протоки, що підвищує тиск у протоці підшлункової залози та активний рефлюкс трипсину. Гострий панкреатит виникає тоді, коли внутрішньоклітинні захисні механізми запобігають активації трипсиногену або знижують активність трипсину [12].

Більше третини етіології ГП становлять патології з жовчним міхурем, зокрема утворення жовчних каменів. Стандартним інструментом діагностики захворювань жовчовивідних шляхів є ультразвукове дослідження (УЗД) черевної порожнини, проте чутливість цього методу при ГП знижується до 80% через перекриття заповнених повітрям петель кишечника або малих розмірів каменів. Важливо зазначити, що відсутність дилатації жовчних шляхів на УЗД не виключає каменів загальної жовчної протоки як етіології ГП, особливо в перші 48 годин від початку. Тому, одними із маркерів диференційної діагностики ГП є пошук біохімічних маркерів [13].

Важкі форми гострого біліарного панкреатиту можна пояснити стійкою обструкцією ампули каменем загальної жовчної протоки. З цієї причини спочатку була запропонована рання діагностика цієї патології з ендоскопічною сфінктеротомією як стандартна частина лікування гострого біліарного панкреатиту. Однак результати п'яти проспективних рандомізованих клінічних досліджень привели до суперечливих результатів у пацієнтів з передбачуваним тяжким ГП: супутня обструкція жовчних шляхів або холангіт [14]. З іншого боку, пацієнти з гострим біліарним панкреатитом, які не отримували холецистектомію (через супутні захворювання або недіагностовані жовчні камені), мають високий ризик (близько 30%) рецидиву ГП. У цьому контексті важливість правильної ідентифікації біліарної етіології підкреслюється одним дослідженням, яке виявило вищу смертність у рецидивуючих випадках гострого панкреатиту [15].

Припускають, що гострий біліарний панкреатит та інші причини ГП мають спільний патогенез. Гіперстимуляція підшлункової залози та обструкція протоки підшлункової залози збільшують тиск у протоці підшлункової залози, активний рефлюкс трипсину та подальшу нерегульовану активацію трипсину в ацинарних клітинах підшлункової залози. Активація ферментів у підшлунковій залозі призводить до самоперетравлення залози та місцевого запалення [12]. Все це робить необхідним пошук ранніх маркерів диференційної діагностики гострого біліарного та небіліарного панкреатиту.

Отже, знання патогенезу різних видів ГП та рання диференційна діагностика їх дозволять вдосконалити традиційні терапевтичні стратегії проти ГП. При лікуванні гострого панкреатиту слід підтримувати декомпресію тиску в панкреатичних протоках, що може значно покращити його результат.

1.2. Біомаркери у встановленні діагнозу гострого панкреатиту

Діагноз ГП зазвичай базується на поєднанні клінічних результатів, лабораторних досліджень і методів візуалізації. На даний момент не існує золотого стандарту тесту для діагностики ГП. Відповідно до переглянутої класифікації та діагностики ГП використовують два із наступних трьох критеріїв [16]:

1. Біль у животі, характерний для ГП (гострий початок постійного сильного болю в епігастрії, який часто іррадіює в спину).
2. Активність ліпази (або амілази) сироватки щонайменше в три рази перевищує верхню межу референтного інтервалу.
3. Характерні результати візуалізації ГП при комп'ютерній томографії (КТ) з контрастним посиленням і рідше при магнітно-резонансній томографії (МРТ) або трансабдомінальному УЗД.

Панкреатичні ферменти, отримані з ацинарних клітин підшлункової залози (амілаза, ліпаза та профермент трипсиноген), є наріжним каменем у лабораторній діагностиці ГП. Сироваткова амілаза – найбільш чутливий і специфічний біохімічний маркер ГП. Його частіше використовують для діагностики ніж ліпазу. Крім того, рівень сироваткової ліпази не дає додаткових переваг, якщо одночасно вимірювати з сироватковою амілазою [17].

Додаткові біомаркери, які оцінюються для діагностики ГП, включають панкреатичну ізоамілазу, панкреатичну еластазу, трипсин сироватки, пептид, активований трипсиногеном сечі, фосфоліпазу A2 і карбоксипептидазу B [1].

Сироватковий трипсин і еластаза представляють особливий інтерес через їх довший період напіввиведення, що робить їх корисними в діагностиці під час відстрочених проявів. Ці тести, однак, не знайшли великої переваги в клінічному застосуванні через ряд причин, включаючи нижчу діагностичну точність порівняно з амілазою та ліпазою, громіздкі методики або доступність [18].

α -Амілаза

α -Амілази (КФ 3.2.1.1) – ензими класу гідролаз, які гідролізують α -1,4-глікозидні зв'язки у молекулах глікогену, крохмалю та ін. Належить до глікозидгідролази, яка в основному виробляється в підшлунковій і слинних залозах і в дуже малих кількостях в інших тканинах [12]. Цей ензим каталізує гідроліз внутрішніх альфа-глюкозидних зв'язків у крохмалі та інших споріднених оліго- та полісахаридах. Ці ферменти широко поширені в організмі людини. У людини α -амілаза міститься в секреті слини та підшлункової залози. α -амілаза підшлункової залози людини – це один поліпептидний ланцюг, який складається із 496 амінокислот, який зв'язується з основними іонами кальцію та хлору та відповідає за гідроліз частково перетравленого крохмалю (менших олігосахаридів), що надходить у кишечник, до глюкози. Інгібування α -амілази – це ефективна мішень для лікування діабету [19].

При ГП рівень α -амілази в крові швидко зростає протягом шести годин від початку захворювання, має період напіврозпаду 10-12 годин, залишається підвищеним протягом 3-5 днів і, нарешті, виводиться нирками. Після досягнення максимального рівня подальше повернення α -амілази в сироватці крові до нормального рівня не корелює з усуненням клінічних симптомів. Крім того, величина гіперамілаземії не демонструє суттєвої статистичної кореляції з тяжкістю захворювання та кінцевим прогнозом [20]. У 19–32% випадків активність α -амілази може бути нормальною на момент госпіталізації через відстрочену інфекцію або екзокринну недостатність підшлункової залози (хронічний алкоголізм). Підвищений рівень α -амілази в сироватці також можна виявити при багатьох інших інтраабдомінальних запальних станах і розладах виділення слини, а також у пацієнтів зі зниженим нирковим кліренсом [21]. Макроамілаземія – це стан, при якому α -амілаза залишається зв'язаною з імуноглобулінами або полісахаридами з утворенням комплексів великої молекулярної маси, що призводить до підвищення рівня α -амілази в сироватці. Гіпертригліцеридемія конкурентно заважає аналізу α -амілази, тому у пацієнтів з гіпертригліцеридемією можна виявити помилково низький рівень α -амілази в сироватці. Чутливість і специфічність α -амілази як діагностичного тесту на ГП залежить від її порогового значення. При пороговому рівні 1000 МО/л він має чутливість приблизно 55–84% і специфічність до 95% [18].

Ліпаза

Ліпази відносяться до ензимів третього класу гідролаз, що каталізують реакції гідролітичного розщеплення естерних зв'язків у молекулах ліпідів, тобто вони розщеплюють триацилгліцероли до вільних жирних кислот та гліцеролу. Експресуються та активні в багатьох тканинах; наприклад, печінкові ліпази знаходяться в печінці, гормоночутливі ліпази знаходяться в адипоцитах, ліпопротеїнова ліпаза знаходиться на поверхні ендотелію судин, а панкреатична ліпаза знаходиться в тонкому кишечнику [23].

Ліпази в секреті підшлункової залози відповідають за перетравлення і гідроліз жиру та всмоктування жиророзчинних вітамінів. Розуміння функції ліпази має вирішальне значення для патофізіології жирового некрозу та гострого та хронічного панкреатиту. Крім того, ліпази відіграють важливу роль у механізмі дії деяких препаратів, які знижують рівень холестеролу [24].

Під час діагностики ГП ліпазний аналіз має чутливість і специфічність 80% і 60% відповідно. Концентрація ліпази в сироватці крові зростає протягом 3-6 годин від початку захворювання і досягає піку протягом 24 годин. Підвищений рівень у сироватці крові зберігається протягом приблизно 7–14 днів, перш ніж знизиться до нормального рівня. На відміну від α -амілази, ліпаза реабсорбується в ниркових канальцях і довго зберігається у високих концентраціях, що забезпечує більшу чутливість у пацієнтів із відстроченим проявом. Панкреатична ліпаза в чотири рази активніша за α -амілазу, і на неї менше впливає екзокринний дефіцит підшлункової залози, що виникає у пацієнтів з хронічним панкреатитом [25].

Гіпертригліцеридемія не впливає на аналіз сироваткової ліпази, як це відбувається у випадку сироваткової α -амілази. Пацієнти, які приймають фрусемід, можуть демонструвати підвищену активність ліпази. Підвищення рівня ліпази в сироватці крові також можна спостерігати при багатьох інтраабдомінальних патологіях, включаючи гострий холецистит, апендицит, запальні захворювання кишечника, ішемію кишечника, непрохідність, перфорацію та ниркову недостатність. Відповідно до останніх рекомендацій, сироватковій ліпазі надають переваги під час діагностики ГП над сироватковою α -амілазою. При пороговому рівні 600 МО/л більшість досліджень повідомляють про специфічність понад 95%; однак чутливість рівня сироваткової ліпази обмежена між 55–100%. Подібно до α -амілази, більшість досліджень показують слабку кореляцію між активністю ліпази та тяжкістю захворювання [26].

Трипсиноген і трипсин

Трипсин (КФ 3.4.21.4) – ензим, який належить до серинових протеаз, виявляється в травній системі та виділяється разом із панкреатичним соком у тонку кишку, де відбувається розщеплення протеїнів [27].

Неактивним попередником панкреатичного ензиму трипсину є трипсиноген який утворюється в підшлунковій залозі та розщеплюється дуоденальною ентерокиназою з утворенням активного ферменту трипсину та пептиду, активованого трипсиногеном [18].

У нормі трипсиноген (трипсиноген-1 і трипсиноген-2) секретується в підшлункову рідину ацинарними клітинами, невелика кількість якого потрапляє в кровообіг і виводиться з сечею. При панкреатиті велика кількість цього ферменту потрапляє в системний кровотік через підвищення проникності судин і, як наслідок, підвищується кліренс із сечею. Це лежить в основі використання трипсиногену в діагностиці та оцінці тяжкості ГП [28].

Концентрації як у сироватці крові, так і в сечі підвищуються протягом кількох годин після початку захворювання та знижуються до нормального рівня протягом 3–5 днів. Для швидкого виявлення ГП був розроблений метод тест-смужки з використанням трипсиногену-2 в сечі. Через низьку чутливість і меншу доступність цей тест рідше використовується в рутинній клінічній практиці [26]. Найбільшим недоліком трипсиногену як діагностичного тесту є його швидкий розпад, що означає, що його можна використовувати лише на ранніх стадіях. Це може бути корисним тестом для скринінгу індукованого ГП [29].

1.3. Роль біохімічних та імунологічних показників у прогнозуванні тяжкого гострого панкреатиту

Оцінка тяжкості ГП здійснюється багатофакторними системами, які використовують загальні клінічні та біохімічні параметри для прогнозування тяжкості. Деякими з найбільш часто використовуваних систем є оцінка

Рансона, Глазго та APACHE II. Обмеження цих систем підрахунку балів включають затримку повного підрахунку балів, коли це займає 48 годин, щоб завершити оцінку Рансона, а системам підрахунку Глазго потрібно 48 годин, щоб завершити оцінювання, тоді як оцінка APACHE II є дуже громіздкою для розрахунку. Ці недоліки спонукають більшість дослідників знайти єдиний біохімічний параметр, який міг би точно передбачити тяжкість ГП на ранніх стадіях захворювання. Одним з таких маркерів є С-реактивний протеїн (СРП) [21].

СРП є реактантом гострої фази, синтезованим гепатоцитами, і зазвичай підвищується при запальних станах. При цьому можуть синтезуватися протеїни гострої фази, одним із яких є СРП. Цитокіни, такі як IL-6, є потужними індукторами синтезу СРП у печінці. Потрібно майже 72 години, щоб рівень СРП у сироватці досяг піку після появи симптомів ГП. Сьогодні це єдиний біомаркер, який найчастіше використовують для оцінки тяжкості ГП. Це тому, що він недорогий, широко доступний і його легко виміряти. Концентрація понад 150 мг/дл часто вважається предиктором тяжкості ГП. На цьому пороговому рівні СРП має чутливість 80–86% і специфічність 61–84% для діагностики некротизуючого панкреатиту протягом перших 48 годин після появи симптомів [30]. У деяких дослідженнях виявлена 100% чутливість і 81,4% специфічність для діагностики панкреонекрозу. Недоліком використання СРП як маркера при ГП є його відстрочений пік (48–72 години) і його неспецифічний характер як маркера запалення. Перед вимірюванням СРП слід виключити інші запальні захворювання, такі як холангіт і пневмонія [31].

Як імунологічні маркери для визначення тяжкості стану ГП використовують інтерлейкіни, зокрема інтерлейкін-6 (IL-6). IL-6 виробляється широким спектром клітин, таких як моноцити, макрофаги, ендотелії і фібробласти, у відповідь на потужний прозапальний стимул, такий як TNF-альфа та IL-1 β . Велика кількість досліджень вже підтвердила роль IL-6 у ранньому та точному прогнозуванні тяжкості ГП [30]. Значення IL-6 значно

підвищується в день госпіталізації та має тенденцію до піку через 72 години після клінічного початку захворювання, що робить IL-6 відмінним маркером ранньої стратифікації тяжкості [31]. З точки зору прогнозування ускладнень, було встановлено, що IL-6 чудово підходить для прогнозування недостатності віддалених органів, яка є невід'ємною частиною тяжкого ГП. Серед різних прозапальних і протизапальних цитокінів IL-6 має найкращу чутливість і специфічність для ранньої оцінки ГП. Основним недоліком аналізу IL-6 є те, що його концентрація в сироватці крові знижується дуже швидко. Використання IL-6 у рутинній клінічній практиці обмежене його вартістю та складністю аналізу [32].

Найкращим представником родини хемокінів, який вивчений при ГП є IL-8. Це потужний вторинний хемоаттрактант нейтрофілів у запальному процесі. Багато досліджень показали багатообіцяючі результати щодо раннього прогнозування ГП. Одне дослідження показало його роль у моніторингу небезпечних для життя ускладнень у пацієнтів з некротичним панкреатитом із поліорганною недостатністю [33].

IL-12, IL-15 та IL-17 є прозапальними цитокінами, які нещодавно вивчалися як потенційні біомаркери. Подібні результати спостерігалися в різних дослідженнях як окремі біохімічні маркери в день прийому. IL-6, IL-8 та IL-10 показали багатообіцяючі результати щодо прогнозування тяжкого ГП [32].

Нейтрофіли

Нейтрофіли є полінуклеарними білими кров'яними клітинами і одними з головних реакцій на гостре запалення. Білі кров'яні тільця зазвичай є першим типом клітин, що залучаються до вогнища запалення та борються з патогенними мікроорганізмами за допомогою різних механізмів. У людини нейтрофіли становлять 50–70% усіх циркулюючих лейкоцитів [31].

Міграція нейтрофілів до вогнища запалення має важливе значення для очищення від інфекції, а значне зниження кількості нейтрофілів у крові може призвести до серйозного імунодефіциту. На додаток до очищення патогенів

при гострих інфекціях, нейтрофіли відіграють важливу та несприятливу роль у інших захворюваннях, пов'язаних із запаленням [34].

Типові ознаки ураження підшлункової залози та велика кількість запальних клітин, включаючи нейтрофіли та макрофаги, спостерігалися у зразках тканини підшлункової залози, взятих у пацієнтів із ГП та на тваринних моделях. Вважається, що нейтрофіли є першими імунними клітинами, які залучаються до запальної тканини у разі гострого запалення. Нейтрофіли відіграють важливу роль у системних ушкодженнях і смерті, пов'язаних із ГП [35].

Нейтрофіли походять від мієлоїдних клітин-попередників у кістковому мозку та регулюються багатьма факторами транскрипції, протеїнами та рецепторами. Основним регулятором нейтрофілів є гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор.

Під час процесу ГП нейтрофіли в тканині підшлункової залози, здається, надмірно активовані або неналежним чином рекрутуються, що призводить до пошкодження підшлункової залози [32].

Отже, нейтрофіли, при вивільненні гранулоцитів і утворенні позаклітинних пасток нейтрофілів беруть участь у загостренні ГП. З відкриттям нового механізму нейтрофілів при ГП можна використовувати більш точну або цілеспрямовану терапію для обмеження опосередкованого нейтрофілами руйнування, мінімізації пошкодження підшлункової залози та системного запалення, а також мінімізації пошкодження імунітету пацієнта.

1.4. Маркери порушення гепатобіліарної системи як потенційні біомаркери для прогнозування тяжкості біліарного гострого панкреатиту

Одними із прогностичних біохімічних маркерів для ранньої діагностики ГП можуть бути маркери, які часто використовують для визначення функціонального стану гепатобіліарної системи. До цих маркерів

можна віднести ензимні активності аланінамінотрансферази (АЛТ), лужної фосфатази (ЛФ), γ -глутамілтрансферази (ГГТ) та вміст загального білірубіну та його фракцій [36]. Значення у диференційній діагностиці біліарного ГП цих біохімічних показників сьогодні повністю не встановлено. Прогностичність трансаміназ, ЛФ і білірубіну при жовчнокам'яному панкреатиті досі є дискусійною.

Проаналізуємо функціональне значення цих ензимів у організмі людини.

Лужна фосфатаза

Лужна фосфатаза (ЛФ) (КФ 3.1.3.1) – це ензим, який здатний гідролізувати різні фосфатні сполуки. Фосфатазна активність проявляється при оптимум рН в лужному середовищі. У більшості ссавців існує чотири різних ізоферменти: плацентарний, зародкових клітин, кишковий і тканинний неспецифічний (печінка/кістки/нирки) [37]. Це група ізоферментів, розташованих на зовнішньому шарі клітинної мембрани. Вони каталізують гідроліз органічних фосфатних ефірів, які знаходяться в позаклітинному просторі. Цинк і магній є важливими кофакторами цього ферменту. Незважаючи на різноманітний розподіл у тканинах і різні фізико-хімічні властивості ЛФ, їх класифікують як справжні ізоферменти через їх спільну здатність каталізувати ту саму реакцію [38].

ЛФ міститься в цитозолі клітин печінки та каналцевої мембрані гепатоцитів. ЛФ виявляється у знижених концентраціях у різних органах, таких як плацента, слизова клубової кишки, нирки, кістки та печінка. Більше 80% ЛФ у сироватці крові походить із печінки та кісток, з незначною часткою з кишечника. Хоча ензими ЛФ присутні в різних тканинах по всьому тілу, їх точна фізіологічна функція залишається однаковою [39].

Всі ЛФ поділяють на два типи: тканиноспецифічні та тканинненеспецифічні. Тканиноспецифічні ЛФ присутні виключно в кишечнику, плаценті та зародковій тканині, зокрема в тканинах, де вони експресуються в фізіологічних умовах. За певних умов тканиноспецифічні

ЛФ можуть також вносити свій внесок у циркулюючий пул сироваткової ЛФ, коли відбувається посилена стимуляція їх виробництва [40].

Тканинно-неспецифічні ЛФ є клінічно значущими, оскільки вони складають більшу частину циркулюючої фракції в сироватці. Вони кодуються одним геном і експресуються в печінці, кістках і нирках. Навпаки, кишкова ЛФ кодується окремим геном, окремим від того, що відповідає за плацентарну ЛФ. Незважаючи на те, що всі тканинно-неспецифічні ЛФ мають однакову амінокислотну послідовність, вони мають різні бічні ланцюги вуглеводів і ліпідів. Ці унікальні фізико-хімічні властивості надаються через посттрансляційні модифікації ензиму [40].

Аланінамінотрансфераза

АЛТ (КФ 2.6.1.2) – цитозольний ензим, що відноситься до класу трансфераз, який бере участь у метаболізмі амінокислот та каталізує перенесення альфа-аміногрупи від аланіну до альфа-кетоглутарову кислоту з утворенням пірувату і глутамату (рис.1.3) [41].

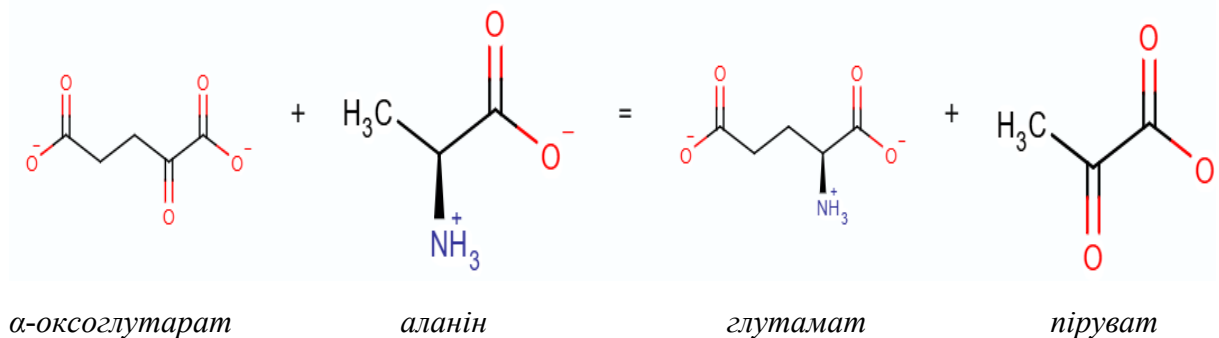


Рис.1.3. Схема реакції, яку каталізує аланінамінотрансфераза

Бере участь у метаболізмі клітинного азоту, а також у глюконеогенезі в печінці, починаючи з попередників, що транспортуються зі скелетних м'язів. АЛТ міститься в плазмі та в різних тканинах організму, але найчастіше зустрічається в печінці. АЛТ (і всі амінотрансферази) потребують коензиму піридоксальфосфату, який перетворюється на піридоксамін на першій фазі реакції, коли амінокислота перетворюється на кетокислоту [42].

АЛТ є ензимом, який в основному агрегується в цитозолі гепатоцита і складається з 496 амінокислот, має період напіврозпаду 47 ± 10 год і кодується геном *ALT*, який знаходиться на довгому плечі хромосоми 8 [41].

АЛТ в основному агрегується в цитозолі гепатоцита, тому активність АЛТ у клітинах печінки приблизно в 3000 разів вища, ніж активність АЛТ у сироватці. Коли відбувається пошкодження печінки, АЛТ вивільняється з пошкоджених клітин печінки і викликає значне підвищення активності АЛТ у сироватці крові. АЛТ також існує в м'язах, жировій тканині, кишечнику, товстій кишці, простаті та мозку, однак концентрація АЛТ у цих органах значно нижча, ніж у печінці [43]. Оскільки АЛТ визнають маркером функціонального стану гепатобіліарної системи, то зміни його активності при диференційній діагностиці біліарного ГП можуть мати велике значення.

γ-Глутамілтрансфераза

ГГТ (КФ 2.3.2.2) каталізує реакцію розщеплення γ-глутамілового пептидного зв'язку глутатіону та глутатіон-S-кон'югату. Перетворює лейкотрієн C4 (LTC4), глутатіон-S-кон'югат, на лейкотрієн D4 (LTD4). Не розщеплює гамма-глутамілові сполуки, такі як гамма-глутаміллейцин. Може також каталізувати реакцію транспептидації на додаток до реакції гідролізу, переносючи гамма-глутамілову частину до акцепторної амінокислоти з утворенням нової гамма-глутамільної сполуки [44]. Діє як негативний регулятор біоактивності геранілгеранілглутатіону шляхом відщеплення його гамма-глутамільної групи, відіграючи роль у адаптивних імунних реакціях.

ГГТ зазвичай експресується на апікальній поверхні проток і залоз, відбираючи амінокислоти з глутатіону в протокових рідинах. Цистеїн обмежує швидкість синтезу глутатіону в клітинах за умов окисного стресу [45].

Загальне рівняння реакції, яку каталізує ГГТ можна представити наступним чином:

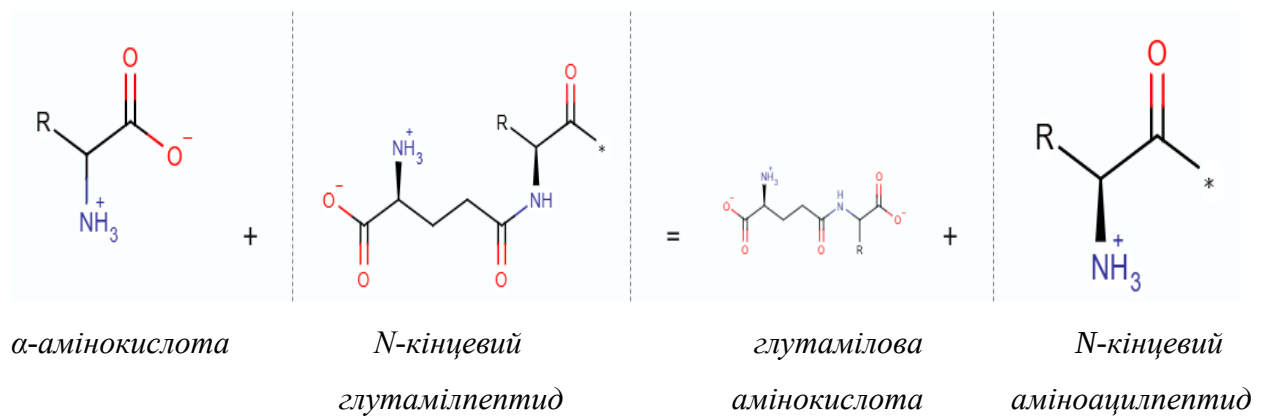


Рис.1.4. Схема реакції, яку каталізує γ -глютамілтрансфераза

Активність ГГТ дозволяла клітинам підтримувати свої внутрішньоклітинні рівні відновленого глутатіону, таким чином протистоячи токсичності стимулюючих сполук [46].

Печінкова ГГТ є мікросомальним ензимом, який знаходиться на поверхні гепатоцитів і епітелію жовчних шляхів. Як і багато інших мікросомальних ензимів може бути індукований алкоголем, фенітоїном, барбітуратами та варфарином. Клінічно основна користь полягає в припущенні печінкового джерела гіперферментемії. Однак він має низьку прогностичну цінність (32%) для гепатобіліарної хвороби, оскільки присутній у багатьох відділах тіла, включаючи проксимальний відділ ниркових каналців, підшлункову залозу (протоки та ацинарні клітини), серце, легені та мозок. Інші клінічні стани, при яких повідомлялося про підвищення ГГТ, включають цукровий діабет, гіпертиреоз, ревматоїдний артрит і хронічне обструктивне захворювання легень [47].

Ще одним маркером стану гепатобіліарної системи є **білірубін**, який виникає в нормальному катаболічному шляху під час розпаду гемму. Цей катаболізм – необхідний процес при руйнуванні застарілих або аномальних еритроцитів. На першому етапі утворення білірубину молекула гемму відокремлюється від протеїну, після чого відбуваються різні процеси катаболізму порфірину. На першому етапі катаболічного шляху утворюється

білівердин, після чого за дії ензиму білівердинредуктази відбувається другий етап, на якому з білірубіну утворюється білівердин [48].

Білірубін вивільняється в плазму і транспортується в печінку, у зв'язаному з альбуміном вигляді. У такому стані він нерозчинний у воді і називається некон'югованим (непрямим) (незважаючи на те, що він зв'язаний з альбуміном). У печінці непрямий білірубін поглинається гепатоцитами і взаємодіє з глюкуроновою кислотою за дії УДФ-глюкуронілтрансфери [47]. Так утворюється кон'югований (прямий) білірубін, розчинний у воді. Прямий білірубін виділяється в жовчні протоки і потрапляє в дванадцятипалу кишку, під час чого він перетворюється на уробіліноген, який відновлюється до стеркобіліногену та виводиться з калом. Білірубін може слугувати діагностичним маркером для диференціації різних видів ГП [49].

Отже, для диференційної діагностики біліарного та небіліарного ГП можна використовувати наступні показники:

- маркери функціонального стану підшлункової залози – рівні в сироватці крові амілази, ліпази і трипсиногену;
- маркери функціонального стану гепатобіліарної системи – ензимні активності АЛТ, ЛФ, ГГТ та вміст загального білірубіну і його фракцій;
- маркери гострої фази запалення – СРП.

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкт та методи досліджень

Під час проведення експериментальної частини роботи було проаналізовано історії хвороб 16 пацієнтів, які зверталися за медичною допомогою з приводу ГП або загострень хронічного панкреатиту.

Аналіз медичних карток включав вік хворих, стать, ожиріння, клінічні дані (гарячка, інтервал між початком госпіталізації) і стандартні показники крові. Усі випадки порушень у жовчевивідних шляхах були підтверджені серійним УЗД черевної порожнини.

Аналіз результатів проводився як у чоловіків, так і у жінок. Середній вік досліджуваних складав 51 рік.

Аналіз етіології ГП показав, що у 50 % хворих була біліарна етіологія ГП. У іншій частині 50 % хворих виявлена небіліарна етіологія ГП. Серед небіліарної етіології ГП у частини пацієнтів причиною ГП був алкоголізм (алкогольна етіологія) та гіпертригліцеридемія.

Під час надходження у стаціонар всім пацієнтам проводили ретельне обстеження, під час якого використовували загальноприйняті клінічні, лабораторні та інструментальні методи.

Усіх обстежених поділили на дві групи в залежності від виду ГП:

I група – 8 хворих, у яких спостерігався небіліарний ГП;

II група – 8 хворих, у яких виявлений ГП біліарної етіології

Аналіз крові на визначення біохімічних показників проводився під час надходження хворих у стаціонар з приводу ГП.

У плазмі крові визначали маркери функціонального стану підшлункової залози – ензимні активності α -амілази, ліпази та трипсину. Також біохімічне дослідження крові проводилося на визначення активності основних маркерів функціонального стану гепатобіліарної системи – ензимних активностей АЛТ, ГГТ, ЛФ та вмісту загального білірубуну. Окрім того визначали вміст основного протеїну запальної відповіді – вміст СРП.

Кров у хворих відбиралася із ліктьової вени вранці натще.

Визначення α -амілазної у плазмі крові (метод Каравея)

Принцип методу полягає в тому, що під час додавання крохмалю у пробу він гідролізується за дії α -амілази до відповідних похідних. Утворені продукти реакції не дають кольорової реакції на йод. За зміною інтенсивності забарвлення розчину з йод-крохмальним комплексом можна судити про активність α -амілази. Зниження інтенсивності забарвлення прямо пропорційне активності ензиму в аналізованій пробі [50].

Хід визначення

Методику проводили за схемою, яка наведен в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Хід проведення процедури визначення активності α -амілази

Реактиви, які необхідно додати у пробірку	Холоста проба	Дослідна проба
Субстратно-буферний розчин	0,5 мл	0,5 мл
Проби прогривають 5 хвилин при температурі 37 °С на водяній бані. По мірі проходження 5 хв у пробірки, які перебувають на водяній бані додають наступні реагенти.		
Зразок плазми крові	-	0,01 мл
Пробірки перемішують та продовжують інкубувати 5 хвилин при температурі плюс 37 °С		
Водний розчин інгібітора	4,5 мл	4,5 мл
Зразок плазми крові	0,01 мл	-
Розчин йоду 0,1 Н	0,05 мл	0,05 мл
Не пізніше, ніж через 10 хвилин після закінчення терміну інкубації у зразках вимірюють оптичну щільність. Дослідну пробу ($E_{\text{досл}}$) і холосту пробу ($E_{\text{холост}}$) вимірюють проти дистильованої води. Аналіз проб показує, що забарвлення реакційної суміші може бути від світло-коричневого до синьо-зеленого. Це залежить від		

ензимної активності α -амілази.

Показники знімають на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 640 нм та довжині оптичного шляху 10 мм.

Розрахунок результатів проводять за наступною формулою:

$$\alpha\text{-амілазна активність, мг/ (год}\times\text{мл)} = \frac{E_{\text{холост}} - E_{\text{досл}}}{E_{\text{холост}}} \times 240 \times K,$$

де $E_{\text{досл}}$ – оптична щільність дослідної проби;

$E_{\text{холост}}$ – оптична щільність холостої проби;

K – коефіцієнт розведення зразка.

Межа референтних значень активності ензиму при 37 °С у плазмі крові становить 12-32 мг/ (год $\times$ мл).

Визначення ліпазної у плазмі крові

Принцип методу полягає в тому, що хромогеновий субстрат ліпази, а саме 1,2-о-дилаурил-гліцеро-3-глутарат-(6-метилрезоруфін) гідролізується за дії ліпази та утворюється продукт реакції – 1,2-о-дилаури-гліцерол і нестабільний проміжний ефір глутарату – 6-метилресоруфін. Ця проміжна речовина розкладається при високих рН (в лужному середовищі), у результаті чого утворюється глутарат і метилресоруфін [50].

Ліпазна активність в пробі пропорційна утвореному метилресоруфину. Визначають оптичну щільність метилресоруфину.

Хід визначення

Перед початком роботи робочий реагент і к'ювети нагрівають до температури 37°С. Методику проводили за схемою, яка наведен в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Хід проведення процедури визначення активності ліпази

	Бланк	Стандарт	Проба
Дистильована вода	10 мкл	-	-
Стандартна проба	-	10 мкл	-
Проба плазми крові	-	-	10 мкл
Реактив 1 (трис-буферний розчин, рН 8,3, коліпаза, дезоксихолат, тауродезоксихолат)	1 мл	1 мл	1 мл
Реактив 2 (тартратбуферний розчин рН 4,0)	200 мкл	200 мкл	200 мкл
Проби перемішують та інкубують при 37°C протягом 1 хвилини.			

Спочатку вимірюють початкову оптичну щільність, після чого вимірюють оптичну щільність через першу і через другу хвилини. Середнє значення зміни оптичної щільності підраховують за хвилину як для стандарту, так і для дослідної проби.

Межі референтних значень активності ліпази в плазмі крові становлять 5,6-51,3 Од/л.

Визначення ензимної активності трипсину в плазмі крові

Принцип методу полягає в тому, що денатурований гемоглобін перетворюється в стандартних умовах в нерозщеплений гемоглобін, який осаджують трихлороцтовою кислотою, кількість неосаджених продуктів розщеплення білка прямопропорційна активності трипсину. Їх кількість оцінюється за допомогою фенолового реагенту, який дає синє забарвлення [50].

Хід визначення

Оцінка активності трипсину проводилася за використанням субстрату гемоглобіну.

Спочатку готується розчин, який містить 8 мл 1 н. NaOH, 72 мл дистильованої води, 36 г сечовини і 10 мл 22% гемоглобіну (22 г гемоглобіну на 100 мл розчину). Цей лужний розчин витримують при 25 °С протягом 30-60 хв для денатурації гемоглобіну і потім змішують з розчином, що містить 10 мл 1 моль /л дигідрофосфата калію і 4 г сечовини. Кінцеве значення рН повинно становити 7,5.

До кожних 50 мл розчину гемоглобіну додають 1 мг мертіолату (Lilly) як консервант. Розчин гемоглобіну зберігають при 5 °С протягом тижня.

Для визначення активності трипсину автоматичною піпеткою додають 4 мл 2,5% розчину гемоглобіну, 1 мл 0,3 моль/л соляної кислоти. Кінцеве рН повинно становити 1,6. Для запуску реакції додають 1 мл дослідної проби. Пробірки інкубують при температурі 37 °С протягом 10 хвили, після чого додають 1,0 мл 0,3 моль / л трихлороцтової кислоти. Проби центрифугують. Білок осідає в розчин, а в надосаді залишаються гідролізовані залишки.

Вимірюють оптичну щільність при 650 нм.

Межі референтних значень активності трипсину в плазмі крові становлять 60-240 мкмоль/ год на мл.

Визначення ензимної активності лужної фосфатази в плазмі крові

Принцип методу полягає в тому, що в процесі реакції в одиницю часу утворюється р-нітрофенол, кількість якого прямо пропорційна активності лужної фосфатази. Оптичну щільність р-нітрофенолу, утвореного в реакції, визначали фотоколориметрично при 405 нм [51].

Хід визначення

Відбирають дві пробірки – дослідну і контрольну, в які вносять по 0,5 мл робочого реагенту. Робочий реагент готували шляхом змішування реагенту №1 та реагенту №3 (з набору) у співвідношенні 3:1).

Після цього в дослідну пробірку вносили 50 мкл плазми крові, а у контрольну пробірку додавали 50 мкл дистильованої води.

На наступному етапі проби інкубували протягом 30 хвилин при $+37^{\circ}\text{C}$, після чого пробірки охолоджували та фотометрували. При цьому використовували кювети товщиною поглинаючого шару 1 см. Оптичну щільність дослідної пробірки міряли проти контрольної проби при довжині хвилі 405 нм.

Під час проведення методики необхідно враховувати, що ензимна активність ЛФ сильно залежить від буферної системи, яку використовують для проведення аналізу. Тому, не можна порівнювати результати, які отримували в гліциновому і діетаноламіновому буферах. Це враховують при визначенні нормальних значень активності ЛФ, які вимірювали в різних буферних системах.

Розрахунок активності ЛФ проводили з використанням калібрувального графіка. Референтні значення становлять: 98-279 Од/л.

Визначення аланінамінотрансферазної активності в плазмі крові

Принцип методу полягає в тому, що АЛТ каталізує реакцію перенесення аміногрупи з L-аланіну на 2-оксоглутарат при цьому утворюються L-глутамат та піруват. Продукт реакції піруват в пробірках взаємодіє з 2,4-динітрофенілгідразином при цьому утворюється гідразон пірувату, який дає з максимум поглинання при довжині хвилі 520 нм [50].

Хід визначення

У пробірки вносили інкубаційну суміш в об'ємі 0,4 мл, яка містила: фосфатний буфер концентрацією 0,1 моль/л; D,L-альфа-аланін – 0,2 моль/л; 2-оксоглутарат – 2 ммоль/л.

Ініціацію реакції запускали шляхом додавання до інкубаційної суміші 50 мкл плазми крові. Після цього проби інкубували 60 хвилин при температурі $+37^{\circ}\text{C}$.

По закінченні інкубації в дослідну пробу додавали розчин 2,4-динітрофенілгідразину, який попередньо готували в 1 ммоль/л розчині соляної кислоти.

Проби залишали для відстоювання при кімнатній температурі на 20 хвилин. Далі в дослідну і контрольну пробірки вносили 2 мл розчину NaOH у концентрації 4 моль/л. Проби залишали для відстоювання при кімнатній температурі на 20 хвилин. Оптичну щільність дослідної та контрольної проби визначали спектрофотометрично при 520 нм проти холостої проби.

Розрахунок аланіамінотрансферазної активності здійснювали з використанням калібрувального графіка. Для побудови калібрувального графіка використовували робочі стандартні розчини пірувату, який був концентрації 2 моль/л. Проводили відповідне розведення цього розчину.

Ензимну активність АЛТ розраховували за концентрацією продукту (мкмоль), який утворився під час реакції за одну хвилину на 1 мл плазми крові. Норма АЛТ в плазмі крові – 4-41 Од/л.

Визначення γ -глутамілтрансферазної активності в плазмі крові

Принцип методу полягає в тому, що в реакції використовували хромогенний субстрат (L- γ -глутаміл-п-нітроанілін). ГГТ, яка є в пробах, каталізує перенесення L- γ -глутамінового залишку з цього субстрату на гліцил-гліцин, який є дипептидним акцептором і одночасно є буфером. При цьому утворюється п-нітроанілін, концентрацію якого визначали фотоколориметрично [50].

Хід визначення

У пробірки вносили інкубаційну суміш в об'ємі 0,2 мл, яка містила: гліцин-гліциновий буфер концентрацією 0,3 моль/л та хромогенний субстрат – 0,2 моль/л; 2-оксоглутарат – 2 ммоль/л.

Ініціацію реакції запускали шляхом додавання до інкубаційної суміші 50 мкл плазми крові. Після цього проби інкубували 60 хвилин при температурі +37°C.

По закінченні інкубації в дослідну пробу додавали розчин для зупинки реакції. Проби залишали для відстоювання при кімнатній температурі на 20 хвилин. Оптичну щільність дослідної та контрольної проби визначали спектрофотометрично при 480 нм проти холостої проби.

Ензимну активність ГГТ виражали в ОД/л. Норма ГГТ в плазмі крові – 7-50 ОД/л.

Визначення вмісту загального білірубіну в плазмі крові

Принцип методу полягає в тому, що для визначення загального білірубіну використовували кофеїновий реактив. Діазотована сульфанілова кислота при наявності кофеїнового реактиву взаємодіє з вільним та зв'язаним білірубіном та утворює комплекс азобілірубіну, який має рожево-фіолетовий колір. Інтенсивність забарвлення розчину, який утворився в результаті з'єднання білірубіну, прямо пропорційна концентрації загального білірубіну у пробі. Якщо у пробі відсутній кофеїновий реактив, то в реакцію вступає тільки прямий білірубін [50].

Хід визначення

У дві пробірки – дослідну та холосту додають по 0,5 мл плазми крові та по 1,75 мл концентрату кофеїнового реактиву. До складу кофеїнового реактиву входять: бензонат та ацетату натрію, а також кофеїн.

Для кінцевого приготування холостої проби у пробірку ще додають 0,25 мл фізіологічного розчину та 0,25 мл діазосуміш. 0,25 мл діазосуміші також додають і до дослідної проби.

Обидві проби витримують 20 хвилин при кімнатній температурі, після чого вимірюють оптичну щільність дослідної проби проти холостої проби. Вимірювання проводять при довжині хвилі 560 нм при довжині оптичного шляху 10 мм.

Концентрацію загального білірубіну визначають за калібрувальним графіком і виражають у мкмоль/л. Нормальні величини концентрації загального білірубіну становлять 8,5–20,5 мкмоль/л [45].

Визначення вмісту С-реактивного протеїну в плазмі крові

Визначення СРП проводили за допомогою методу імуноферментного аналізу. Принцип методу полягає в тому, що СРП викликає аглютинацію часток латексу, які покриті антитілами до людського СРП. Інтенсивність аглютинації латексних часток пропорційна концентрації СРП в пробах [51].

Хід визначення

Всі реактиви та фотометр нагрівають до температури +37 °С та виставляють “нуль” приладу. У кювети вносять 1 мл робочого реагенту та 7 мкл зразка. Проби перемішують і кювети ставлять у вимірювальну лунку. Абсорбцію (А) вимірюють при 540 нм через 10 секунд (А₁) і через 2 хвилини (А₂).

Розрахунок

$$(A_2 - A_1)_{\text{зразок}} / (A_2 - A_1)_{\text{стандарт}} \times C_{\text{стандарт}} = \text{мг/л СРБ}$$

Референтні значення в крові дорослого до 5 мг/л.

Статистична обробка результатів

Отримані результати обробляли методом варіаційної статистики за допомогою програми Microsoft Excel з використанням t-критерію Ст'юдента. Вірогідними вважали результати, якщо $P \leq 0,05$.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

ГП – один з найпоширеніших шлунково-кишкових проявів, який має різну етіологію та від якої залежить патогенез та подальше лікування цієї патології. Одним із етіологічних факторів ГП є закупорка проток підшлункової залози жовчними каменями. Це призводить до підвищення тиску в протоках, чим створюється накопичення багатой ензимами рідини в тканині органу [34]. Ці особливості дозволяють розвиватися біліарній формі ГП. При цьому неінвазивні методи діагностики, такі як УЗД не завжди можуть виявити причину розвитку клінічних симптомів ГП.

Іншим, найпоширенішим етіологічним фактором ГП небіліарної природи є тривале вживання алкоголю. У більшості випадків індукція спалаху збігається з попередньо встановленим станом хронічного панкреатиту, який може спричинити сильний непрацездатний біль [52]. Ці види ГП вимагають ранньої диференційної діагностики для забезпечення подальшого вибору схеми ефективного лікування.

Диференційна діагностика причинних факторів ГП є фундаментальною для його клінічного перебігу та спостереження за хворими. Одними із можливих маркерів диференційної діагностики ГП є встановлення лабораторних критеріїв, які дозволяють розрізнити різницю між біліарними та небіліарними причинами ГП. Диференційна діагностика ГП біліарної та небіліарної етіології є досить актуальною, оскільки вже на початкових етапах захворювання дозволить передбачити патогенез захворювання та призначити адекватне ефективне лікування. Встановлення критеріїв на основі лабораторних тестів, сприятиме визначенню чутливості лабораторних тестів, що дозволить у майбутньому запропонувати створення алгоритму диференційної діагностики ГП, пов'язаного з причинними наслідками.

На першому етапі здійснювався вибір біохімічних маркерів, які могли б на ранніх етапах сприяти ранній діагностиці ГП. Для визначення перебігу ГП були вибрані маркери функціонального стану підшлункової залози – ензимні

активності α -амілази, лапази та трипсину, які визначали у плазмі крові пацієнтів з небіліарною та біліарною формами ГП.

Оцінка активностей панкреатичних ензимів у плазмі крові показала достовірні зміни деяких з них при небіліарній та біліарній формах ГП.

Результати проведених досліджень показали, що у пацієнтів з ГП після загострення патології у плазмі крові підвищувалася ензимна активність α -амілази. Під час порівняння досліджуваного показника у пацієнтів з небіліарною та біліарною формами ГП виявлена статистично достовірна різниця порівняно з показниками норми. Так, у хворих, у яких спостерігався небіліарний ГП α -амілазна активність перевищувала показник верхньої межі норми у 3,4 разів, а у пацієнтів в яких діагностували біліарну форму ГП α -амілазна активність перевищувала показник верхньої межі норми у 4,2 рази (рис.3.1).

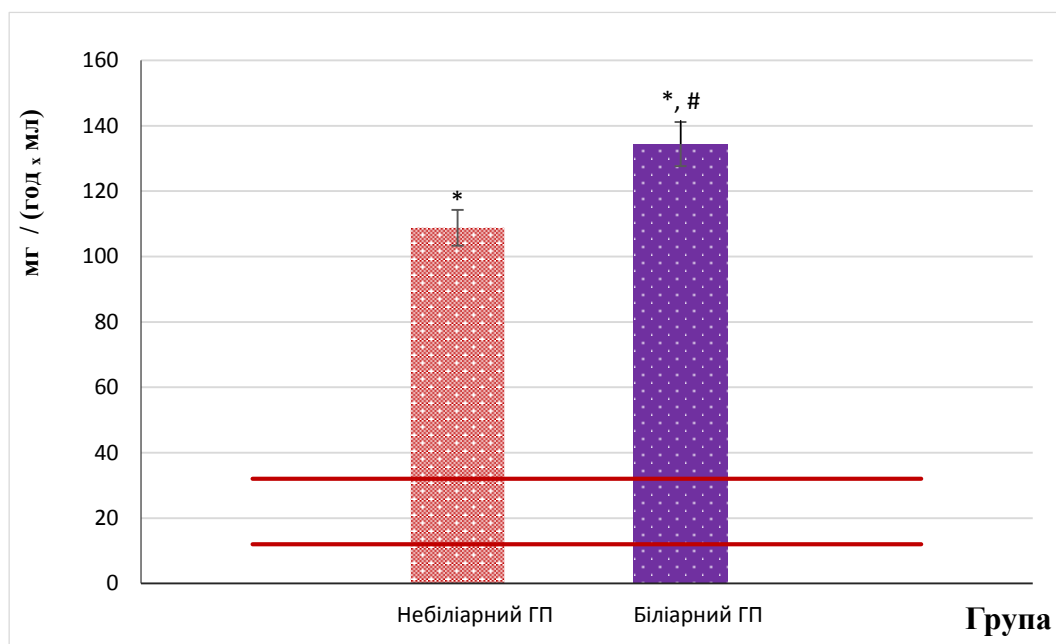


Рис.3.1. α -Амілазна активність у плазмі крові за умов розвитку небіліарного та біліарного гострого панкреатиту

*Примітка (тут і надалі): ГП – гострий панкреатит; * – статистично достовірна різниця порівняно з показниками верхньої межі норми; # – статистично достовірна різниця порівняно з показниками, характерними для пацієнтів з небіліарними гострим панкреатитом.*

Підвищення ензимної активності α -амілази свідчить, що при ГП в паренхімі підшлункової залози відбуваються деструктивні зміни, які призводять до порушень у структурі клітин цього органу, що проявляється виходом ензиму в кров'яне русло. Встановлені зміни також можуть вказувати на функціональну недостатність підшлункової залози [33]. Слід зауважити, що у пацієнтів з біліарною формою ГП спостерігалася статистично достовірні різниці α -амілазної активності порівняно з пацієнтами, у яких спостерігалася небіліарна форма ГП. Проте, за даними літератури, трикратне збільшення активності цього ензиму у крові може лише вказувати на розвиток ГП, проте не можна його використовувати в якості маркера диференційної діагностики небіліарної та біліарної форм ГП.

Фраховуючи отримані результати ми визначили у плазмі крові ензимну активність ліпази, визначення якої є іншим лабораторним тестом, за допомогою якого можна охарактеризувати екзокринну функцію підшлункової залози. Окрім того, за визначенням ліпазної активності в плазмі крові можна оцінити ступінь запального процесу.

Аналіз результатів дослідження показав, що у пацієнтів з небіліарною та біліарною формами ГП у плазмі крові однаковою мірою підвищується ензимна активність ліпази. Так, при розвитку в організмі небіліарної форми ГП ліпазна активність у 2,9 рази перевищувала показники верхньої межі норми (рис.3.2).

Подібні зміни спостерігалися у пацієнтів з біліарною формою ГП, у яких ліпазна активність у плазмі крові у 3,4 рази перевищувала показник верхньої межі норми (рис.3.2). Імовірно, походженням плазмового рівня ліпази є надходження цього ензиму з пошкоджених клітин підшлункової залози.

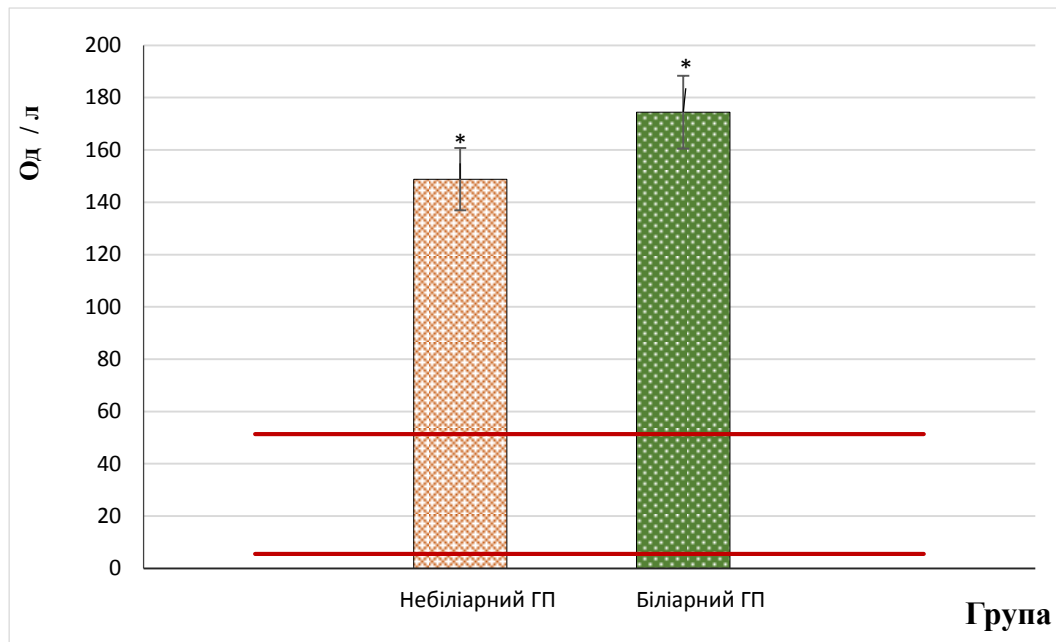


Рис.3.2. Ліпазна активність у плазмі крові за умов розвитку небіліарного та біліарного гострого панкреатиту

З встановлених результатів випливає, що визначення ензимної активності ліпази у плазмі крові пацієнтів з ГП є менш чутливиим тестом порівняно з амілазним тестом. Так, якщо при розвитку ГП амілазна активність підвищується більше ніж у 3 рази в обох досліджуваних групах (рис.3.1), то при визначенні ліпазної активності її значення перевищують показники верхньої межі норми в межах трьох разів (рис.3.2).

Окрім того, ліпаза – це один із ензимів, який виділяється підшлунковою залозою, тому основною причиною підвищення ліпази в плазмі крові може бути не тільки ГП, але й ряд інших захворювань, таких як хронічний панкреатит, гострий холецистит і кишкова непрохідність. Якщо проаналізувати можливість підвищення ліпазної активності при ГП, то рівень ліпази в плазмі крові зазвичай підвищується протягом 4-8 годин, досягає піку через 24 години і знижується до нормального або майже нормального рівня протягом наступних 8-14 днів [38]. Сироваткова ліпаза залишається підвищеною протягом більш тривалого періоду часу порівняно з періодом підвищення сироваткової амілази після ГП, проте на початкових етапах

розвитку ГП для диференційної діагностики небіліарного та біліарного ГП цей тест є менш інформативним ніж амілазний тест [53]. Зазвичай використовується порогове значення, яке втричі перевищує звичайний ліміт.

Отже, у пацієнтів з ГП порушується секреція ензимів підшлункової залози у шлунково-кишковий тракт, про що свідчать підвищенні рівні амілали та ліпази в плазмі крові. Ці ензими відображають зміни функціонального стану підшлункової залози, проте в меншій мірі можуть бути використані для диференційної діагностики небіліарного та біліарного ГП.

У патогенезі ГП одну з провідних ролей може відігравати активація власних протеолітичних ензимів, до яких можна віднести трипсин, хемотрипсин, еластазу. В нормі ці ензими в тканинах підшлункової залози знаходяться у вигляді проферментів. Їхня активація відбувається в просвіті дванадцятипалої кишки з подальшою участю у процесах травлення їжі. Тому, видається актуальним визначення активності одного із цих ензимів – трипсину у плазмі крові [46].

Результати проведених досліджень показали, що за умови розвитку в організмі ГП в плазмі крові підвищується ензимна активність трипсину. Встановлено, що за умов розвитку небіліарної форми ГП в плазмі крові активність трипсину підвищується у 2,4 рази порівняно з показниками верхньої межі норми. Подібні зміни спостерігаються і у пацієнтів з біліарною формою ГП, у яких активність трипсину у плазмі крові у 2,9 рази перевищує значення верхньої межі норми (рис.3.3). Під час порівняння інтенсивності гіперферментемії у двох групах не виявлено статистично достовірної різниці підвищення активності трипсину в плазмі крові в пацієнтів з біліарною формою ГП порівняно з небіліарною формою ГП (рис.3.3).

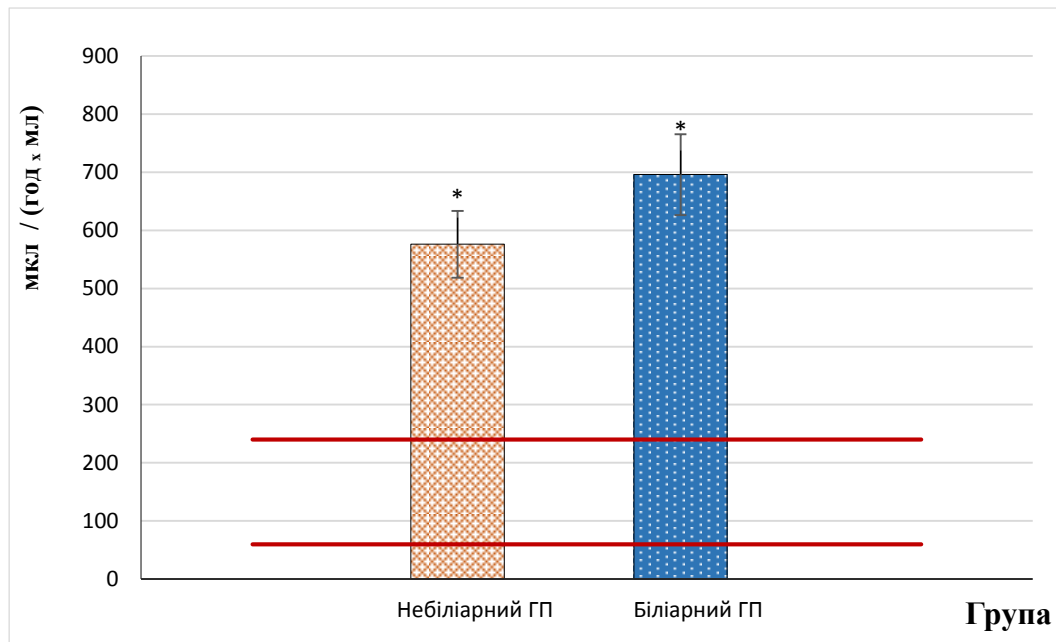


Рис.3.3. Ензимна активність трипсину в плазмі крові за умов розвитку небіліарного та біліарного гострого панкреатиту

Якщо тест на визначення ензимної активності ензиму в плазмі крові немає великого значення у диференційній діагностиці ГП, проте його можна використати як маркер який показує стан тканин підшлункової залози. Відомо, що при ГП активація проферменту трипсину – трипсиногену може відбуватися всередині підшлункової залози з подальшим «самоперетравленням» її тканин. При цьому це буде проявлятися розвитком запальних процесів у цьому органі та виходом трипсину в кров [36].

Надходження трипсину та інших панкреатичних ензимів у кров призведе до розвитку поліорганної патології в організмі хворих. Так, трипсин здатний активувати фосфоліпази панкреатичного соку, які, у подальшому, будуть руйнувати фосфоліпідний бішар клітинних мембран. Це, також може бути одним із факторів, в результаті яких амілаза і ліпаза будуть потрапляти у кров, що і підтверджено нашими дослідженнями.

Отже, ефективність визначення ензимних активностей амілази, ліпази та трипсину в плазмі крові при встановленні діагнозу ГП є подібною. Окрім того у діагностиці небіліарної та біліарної форм ГП вони мають невелике

значення. Тому, необхідний пошук інших маркерів, які б з достовірністю дозволили визначити небіліарну та біліарну форми ГП. До таких маркерів можна віднести маркери функціонального стану гепатобіліарної системи, а саме: ензимні активності АЛТ, ГГТ, ЛФ та вміст загального білірубіну.

Аналіз результатів визначення аланінамінотрансферазної активності показав, що у пацієнтів з біліарним ГП суттєво підвищується ензимна активність АЛТ у плазмі крові, що виявлено перевищенням її активності у 6,6 рази порівняно з верхньою межею норми (рис.3.4). Поряд з цим у пацієнтів з небіліарним ГП аланінамінотрансферазна активність підвищувалася у 2,4 рази порівняно з показниками верхньої межі норми (рис.3.4)

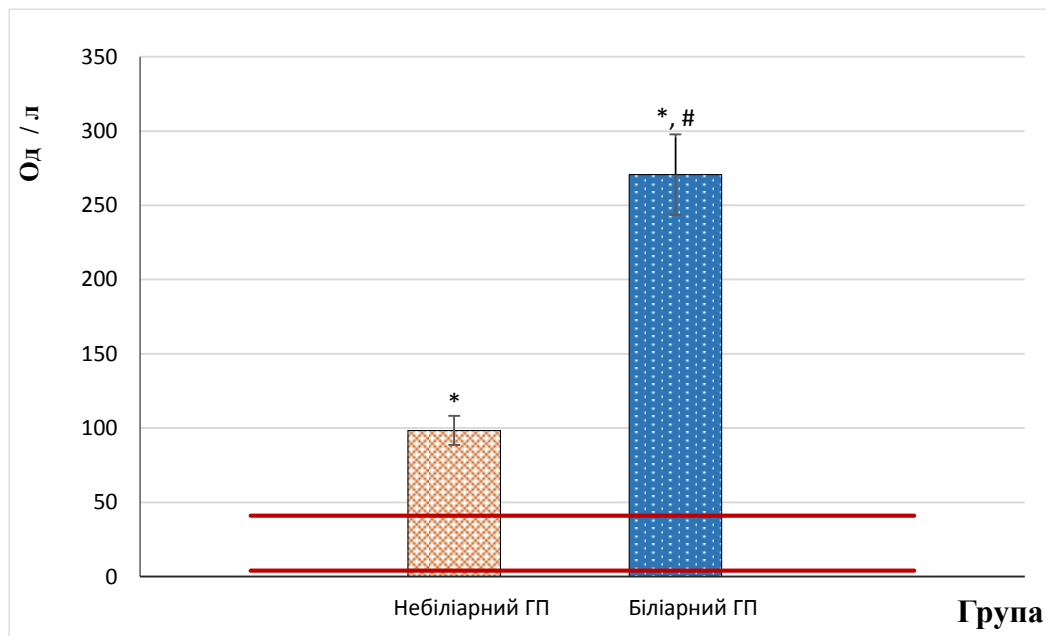


Рис.3.4. Аланінамінотрансферазна активність у плазмі крові за умов розвитку небіліарного та біліарного гострого панкреатиту

Значне підвищення активності АЛТ при біліарній формі ГП може вказувати на порушення функціонування з боку гепатобіліарної системи, що і вважається одним із етіологічних факторів розвитку ГП. Оскільки АЛТ є одним із цитолітичних маркерів стану гепатобіліарної системи, то можна припустити, що підвищення активності цього ензиму в плазмі крові може бути результатом його виходу з клітин печінки.

Відомо, що гепатобіліарні дисфункції в організмі супроводжуються змінами не лише амітрансфераз, але й маркерами, які вказують на холестатичний синдром печінково-клітинної недостатності. До таких маркерів можна віднести плазмовий рівень активності ЛФ [41].

Аналіз результатів показав значне підвищення рівня ЛФ у плазмі крові пацієнтів, у яких діагностували біліарну форму ГП. Так, у цієї групи пацієнтів лужнофосфатазна активність у 5,2 разів перевищувала показник верхньої межі норми (рис.3.5).

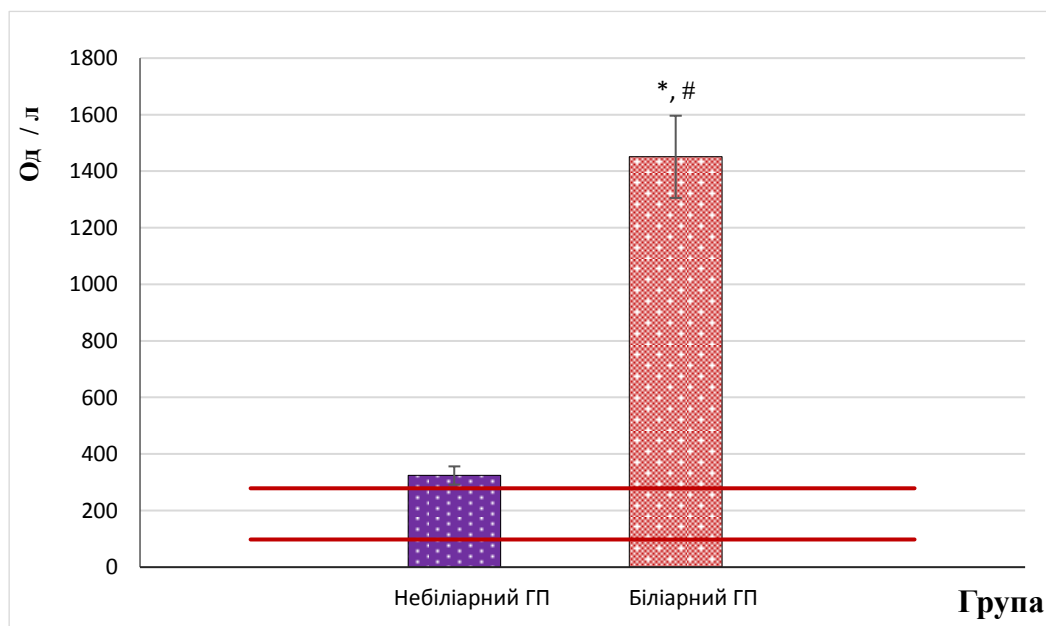


Рис.3.5. Ензимна активність лужної фосфатази у плазмі крові за умов розвитку небіліарного та біліарного гострого панкреатиту

Підвищення лужнофосфатазної активності може бути індикатором холестатичного ураження у пацієнтів із ГП. Гіперферментемія може бути пов'язана з тим, що при обструкції жовчних шляхів досліджуваний ензим потрапляє із клітин у кров, причому саме з тих клітин, які вистилають жовчні протоки. Ензими знаходяться у формі різних ізоформ у плазмолемі як клітин печінки (гепатоцитах), так і в епітелії стінок жовчевих проток.

Визначення лужнофосфатазної активності у плазмі крові пацієнтів з небіліарною формою ГП не показало статистично достовірної різниці порівняно з показниками верхньої межі норми (рис.3.5).

Отже, розвиток біліарної форми ГП може бути пов'язаний із розвитком холелітіазу, на що вказує підвищення активності ЛФ в плазмі крові. Гіперферментемія ЛФ, ймовірно, пов'язана з порушеннями структури епітеліальних клітин жовчевивідних шляхів та деструкцією гепатоцитів.

Ще одними показниками, які вважаються маркера функціонального стану гепатобіліарної системи і можуть бути використані для диференційної діагностики небіліарного та біліарного ГП є ензимна активність ГГТ та рівень загального білірубіну.

Результати дослідження ензимної активності ГГТ показали її підвищення у плазмі крові пацієнтів обох досліджуваних груп, проте статистично достовірної різниці між цими групами не виявлено. Так, γ -глутамілтрансферазна активність у плазмі крові пацієнтів з небіліарною формою ГП підвищувалася у 1,9 рази, а у пацієнтів з біліарною формою – у 2,2 рази порівняно з верхньою межею норми (рис.3.6).

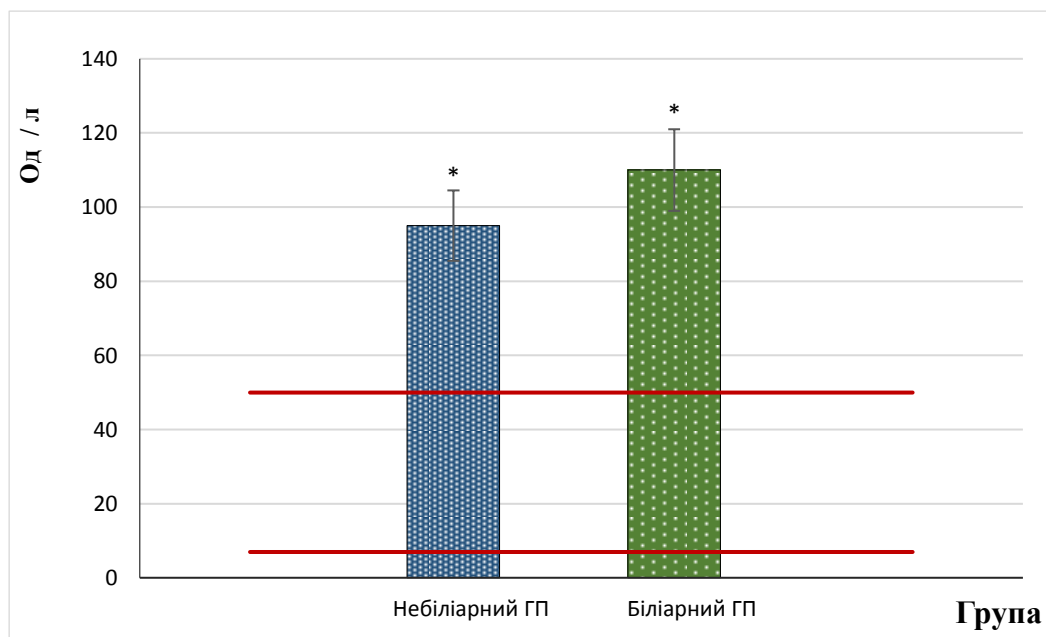


Рис.3.6. γ -Глутамілтрансферазна активність у плазмі крові за умов розвитку небіліарного та біліарного гострого панкреатиту

Подібні результати виявлені для показника вмісту загального білірубіну, коли його підвищення однаковою мірою спостерігалось при небіліарному і біліарному ГП. При біліарному ГП підвищення рівня загального білірубіну було у 2,5 рази, а при небіліарному – у 2,2 рази порівняно з показниками верхньої межі норми (рис.3.7).

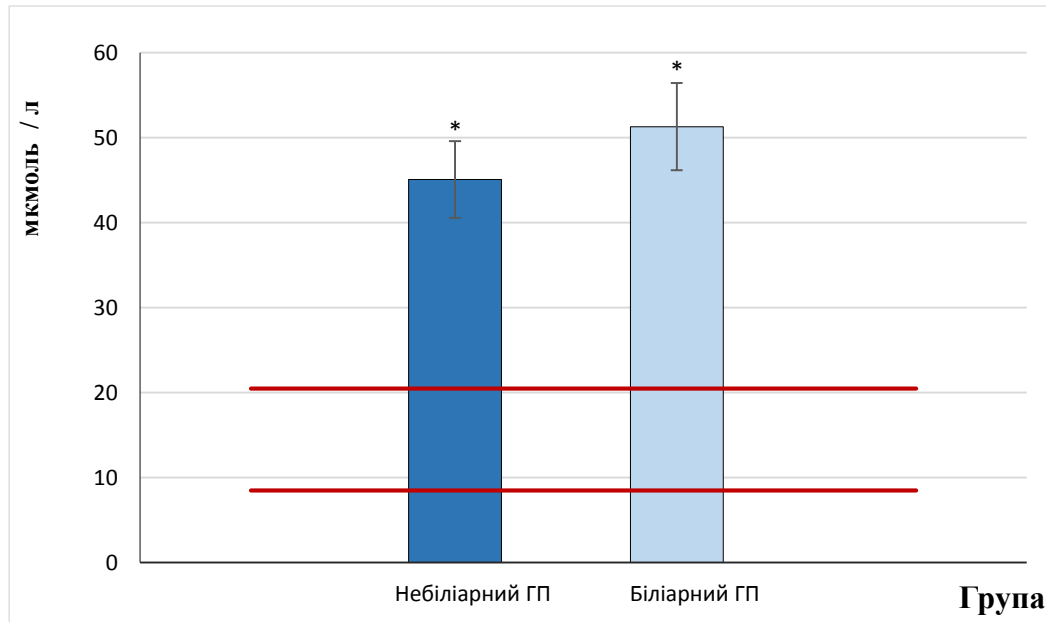


Рис.3.7. Вміст загального білірубіну в плазмі крові за умов розвитку небіліарного та біліарного гострого панкреатиту

Отже, при розвитку в організмі небіліарної та біліарної форм ГП додатковими маркерами для диференційної діагностики цих форм ГП можуть бути показники функціонального стану гепатобіліарної системи. Найбільш значимими серед них є визначення ензимної активності АЛТ та ЛФ у плазмі крові, тоді як ензимна активність ГГТ та вміст загального білірубіну не мають визначного значення для диференційної діагностики цих двох форм ГП.

Оскільки ГП – це патологія, яка характеризується запальними процесами у тканинах підшлункової залози, а «золотим стандартом» у визначенні цього стану є СРП, то нами досліджено його рівень в плазмі крові при цих двох формах ГП.

Результати дослідження показали, що при обох формах гострого панкреатиту виявлене підвищення СРП вище 15 мг / л, тоді як нормою вважається рівень СРП до 5 мг / л. Так, у хворих небіліарним ГП рівень СРП становив $16,8 \pm 1,23$ мг/л, а у хворих з біліарним ГП – $19,5 \pm 1,51$ мг/л (рис.3.8).

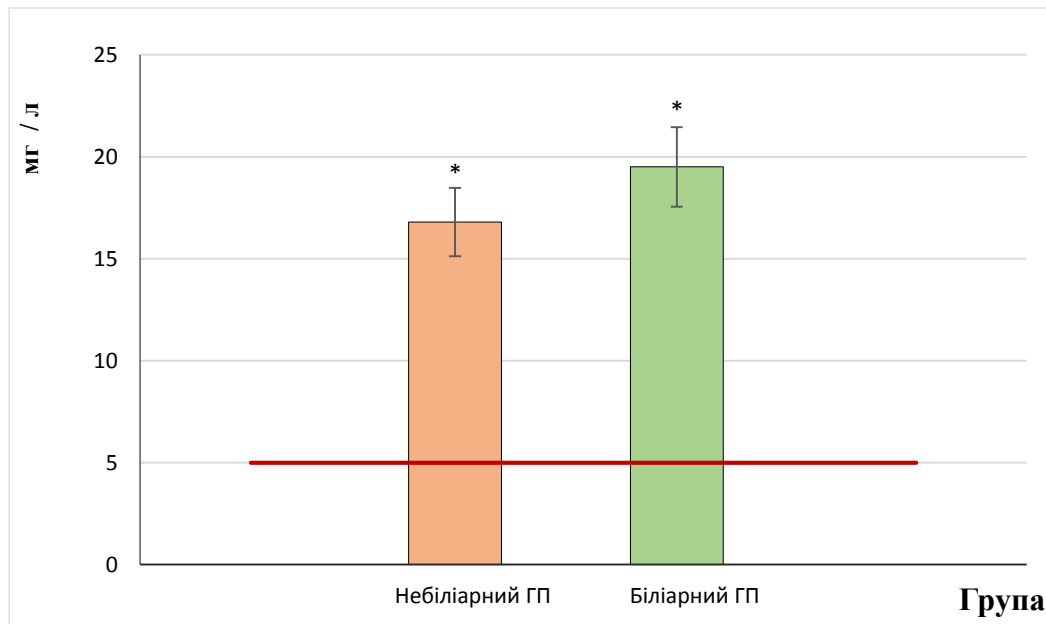


Рис.3.8. Вміст С-реактивного протеїну в плазмі крові за умов розвитку небіліарного та біліарного гострого панкреатиту

Підвищення рівня СРП у плазмі крові вказує на розвиток запальних процесів у хворих з ГП. Як видно з результатів дослідження не виявлено статистично достовірної різниці цього показника між групами з небіліарним та біліарним ГП. Оскільки, СРП є маркером визначення тяжкості ГП, то можна зробити висновок, що в обох групах виявлена легка форма ГП, оскільки при тяжкій формі ГП рівень СРП становить вище 150 мг/л [46, 54].

Отже, оцінка основних біохімічних маркерів розвитку ГП показала, що найвагомішим з них для диференційної діагностики небіліарної та біліарної форм ГП є амілазний тест. Окрім того, при біліарній формі ГП виявлено різке підвищення активності АЛТ та ЛФ.

ВИСНОВКИ

1. Перебіг ГП супроводжується підвищенням в плазмі крові ензимних активностей α -амілази, ліпази та трипсину. Порівняльний аналіз цих показників при біліарній та небіліарній формі ГП показав достовірне підвищення лише амілазної активності при біліарному ГП порівняно з небіліарним.

2. При розвитку білірного ГП у плазмі крові підвищуються ензимні активності АЛТ та лужної фосфатази порівняно з показниками характерними для небілірного ГП. γ -Глутамілтрансферазна активність та вміст загального білірубіну однаковою мірою підвищуються при небіліарному та біліарному ГП.

3. Підвищення вмісту С-реактивного протеїну відбувається однаковою мірою як при небіліарному ГП, так і при біліарному ГП, що вказує на розвиток запальних процесів в тканинах підшлункової залози. Проте цей показник не дозволяє диференційно діагностувати небіліарну та біліарну форми ГП.