

Инфракрасная спектрометрия сыворотки крови в ранней диагностике и оценке степени тяжести острого панкреатита.

М. В. Кукош,
М. С. Петров,
Н. В. Емельянов
Нижегородская
государственная
медицинская
академия, кафедра
факультетской
хирургии (зав. –
проф. М.В. Кукош)

Несмотря на определенные успехи, достигнутые в последние десятилетия в лечении больных с острым панкреатитом, летальность при деструктивных формах панкреатита остается стабильно высокой. Во многом это обусловлено отсутствием однозначных клинико-лабораторных критериев, позволяющих на ранней стадии четко верифицировать морфологическую форму и объем повреждения поджелудочной железы.

Малоизученным направлением неотложной панкреатологии является исследование физико-химических характеристик сыворотки крови. Цель настоящего исследования – разработка способа диагностики и оценки степени тяжести острого панкреатита на основе метода инфракрасной спектрометрии сыворотки крови.

В качестве субстрата для исследования использовали сыворотку крови больных острым панкреатитом, которую высушивали при комнатной температуре на полуприкрытой чашке Петри. Сухой остаток вводили в вазелиновое масло и получали суспензию, которую затем подвергали инфракрасной спектроскопии с регистрацией спектров поглощения в области 1200-1000 см⁻¹.

Обследовано 50 пациентов с острым панкреатитом. Из них 28 больных были с легкой степенью тяжести острого панкреатита, а у 22 больных верифицирован тяжелый панкреатит. В качестве контрольной группы было также обследовано 50 доноров, сопоставимых по полу и возрасту с больными. Авторами было проведено сравнение показателей инфракрасного спектрометрического анализа сыворотки крови больных острым панкреатитом и доноров. Выявлена зависимость показателей инфракрасной спектрометрии крови больных от исходной тяжести состояния, что позволило вычислить дифференциально-диагностические тесты норма – острый панкреатит, панкреатит легкой степени тяжести – тяжелый панкреатит. Полученные результаты подтверждают гипотезу о соответствии инфракрасных спектров уровню нарушения метаболических процессов, а следовательно степени выраженности токсикоза.

Таким образом, применение простого и доступного для исследований в клинических лабораториях метода инфракрасной спектрометрии позволяет повысить качество диагностики морфологических форм острого панкреатита и предоставляет возможность проводить динамическую оценку тяжести течения болезни.

Possibilities of the Blood Serum Infrared Spectrometry in Early Diagnosis and Severity Evaluation of Acute Pancreatitis

M.V. Kukosh,
M.S. Petrov,
N.V. Emeljanov
*Chair of the Faculty
Surgery (Chairman –
Prof. M.V. Kukosh)
Nizhny Novgorod
State Medical
Academy*

Despite definite success in the treatment of the acute pancreatitis in last decade mortality rate in cases of the destructive forms remains still high. In great deal it depends on absence of clinical and laboratory criteria capable to verify early the morphological form and volume of the lesion of the pancreas.

The aim of the investigation was to elaborate the method of early diagnosis and severity evaluation of acute pancreatitis on the bases on the blood serum infrared spectrometry.

The blood serum of pancreatitis patients dried in the Petry cup. Dried residuum mixed with vaseline oil and received suspension subjected to infrared spectroscopy registration of spectr absorbtion in the 1200-1000 cm⁻¹ region.

50 acute pancreatitis patients were studied. 28 out of them had mild grade of pancreatitis and 22 – severe. 50 donors of corresponding gender and age were considered as a control group. Comparing data of blood serum spectroscopy in severe pancreatitis patients with control group dependence of spectrosocopy data on the severity of pancreatitis was reveiled. Received results confirmed the hypotheses that infrared spectroscopy data correspond to the grade of metabolic disturbances and consequently to severity of toxicosis.

So application of the simple and accessible laboratory method of infrared spectroscopy enables to enhance the diagnostic quality of morphologic forms of acute pancreatitis.

Введение.

Характерной особенностью патоморфоза острого панкреатита является формирование разнообразных по тяжести состояния и характеристике клинико-морфологических форм заболевания [1]. Спектр основных вариантов патологического процесса широко варьирует от интерстициального панкреатита до развития осложненных форм стерильного и инфицированного панкреонекроза. При этом системная воспалительная реакция и полиорганная недостаточность при панкреонекрозе определяют интегральную тяжесть состояния больного, прогноз заболевания и выбор оптимальной тактики лечебных мероприятий [2-4].

К числу важных проблем в неотложной панкреатологии относится круг вопросов, связанных с ранней диагностикой деструктивного панкреатита и его инфекционных осложнений, а также объективной оценкой степени тяжести состояния больного в динамике заболевания и комплексного лечения [4,5,6]. При этом особую актуальность данная проблема приобретает в свете внедрения в практическое здравоохранение системы «обрывающей» терапии тяжелого панкреонекроза, в основе которой лежит упреждающая панкреотропная терапия в стадии обратимых патологических изменений в поджелудочной железе [7,8]. Кроме того, на сегодняшний день проблемные вопросы неотложной панкреатологии сосуществуют с относительно неравномерной оснащенностью лечебных учреждений различного уровня современными методами лабораторной (пептиды активации панкреатических проферментов, панкреатические ферменты, антипротеазы, маркеры системной воспалительной реакции, показатели эндогенной интоксикации, иммунологические маркеры) и инструментальной (компьютерная томография, магнитно-резонансная томография, эндоскопическая ультрасонография) диагностики острого панкреатита. В связи с этим поиск точного и относительно простого метода, позволяющего улучшить качество диагностики острого панкреатита, сделать ее более дешевой и доступной в условиях экстренной хирургии является одной из основных проблем абдоминальной хирургии. В этом плане, на наш взгляд, одним из перспективных направлений является исследование физико-химических параметров сыворотки крови.

Целью настоящего исследования явилась разработка нового способа ранней диагностики и оценки тяжести состояния больных острым панкреатитом на основе метода инфракрасной спектроскопии (ИКС) сыворотки крови.

В основе спектроскопических методов лежит измерение зависимости интенсивности поглощения, испускания или рассеяния электромагнитного излучения веществом от частоты света (или длины волны). Закон Бера - один из основополагающих законов спектроскопии, гласит: «Поглощение света пропорционально числу молекул поглощающего вещества на его пути». В оптической спектроскопии используются спектры поглощения в инфракрасной, видимой и ультрафиолетовой областях, а также спектры комбинационного рассеяния света и спектры люминесценции. Для исследования органических веществ наибольшее значение имеет фундаментальная инфракрасная область, лежащая в диапазоне от 5000 до 200 см⁻¹. Линии в области 600-1300 см⁻¹ отличны и специфичны даже для родственных молекул, в связи с чем ее называют областью "отпечатков пальцев" молекулы (fingerprint). ИК-спектр является абсолютно специфическим свойством каждого химического соединения, поэтому даже изомеры положения, геометрические изомеры и молекулы, содержащие протоны, обладают различными спектрами. В связи с вышеизложенным, ИК-спектр каждого вещества имеет отчетливую индивидуальность. Теоретическим обоснованием проводимых нами исследований явилась гипотеза о том, что ИКС позволяет определить появление «патологических» метаболитов, образующихся в процессе аутолиза поджелудочной железы, и исчезновение "нормальных" химических веществ (АТФ, ГТФ и др.), которые при остром панкреатите подвергаются быстрому метаболизму, с образованием соответствующих продуктов гидролиза - монофосфатов.

Интенсивность поглощения в разных частях спектра выражается с помощью абсорбционных кривых, показывающих, как изменяется интенсивность поглощения в областях различных длин волн или обратных им величин - волновых чисел, пропорциональных частотам (волновое число равно 1/λ см⁻¹). Для построения абсорбционных кривых на оси абсцисс откладывают длины волн (или волновые числа), а на оси ординат - величины, характеризующие поглощение. Такой

величиной является, например, процентное отношение I/I^0 , где I^0 - интенсивность света данной длины волны до, а I - после прохождения через исследуемую субстанцию. Определив при помощи фотоэлементов поглощение в различных областях волн, вычерчивается кривая, характеризующая спектр поглощения (абсорбции). Современные приборы "записывают" спектр автоматически, а ИК-спектрофотометры "Specord 80/85 IR" обеспечивают фотометрическую точность $\pm 0,2\%$. Контрольная программа встроенного компьютера не допускает неправильных и несовместимых параметров, обеспечивает графическое построение и линейную корреляцию базисной линии между 16 волновыми числами. Перечисленные факторы обеспечивают объективность и высокую точность спектроскопических анализов.

Материалы и методы.

Клиническому изучению подвергнуты 50 больных (34 мужчин и 16 женщин) острым панкреатитом в возрасте от 29 до 72 лет, госпитализированных в клинику факультетской хирургии Нижегородской государственной медицинской академии в период с 2001 по 2002 гг. Диагноз острого панкреатита ставился на основании комплексного обследования, включающего данные клинических и лабораторных методов. Инструментальные методы диагностики острого панкреатита включали ультрасонографию брюшной полости и забрюшинного пространства, компьютерную томографию, лапароскопию.

Основными критериями включения больных в исследование были:

- четкая верификация диагноза в соответствии с рекомендациями Симпозиума по острому панкреатиту (Atlanta, 1992) [6] и Согласительной конференции по острому панкреатиту (Греция, 1998 г.) [4];
- первые 3 суток от начала заболевания;
- взятие крови до назначения лечения;
- информированное согласие больного.

Основными критерии исключения больных из исследования - наличие у больного:

- инкурабельного сопутствующего заболевания (декомпенсированная печеночная, почечная, дыхательная, сердечно-сосудистая недостаточность);
- опухоли любой локализации;
- гепатита, ВИЧ-инфекции;
- психических заболеваний.

В соответствии с рекомендациями Симпозиума по острому панкреатиту (Atlanta, 1992) выделены две группы больных по степени тяжести. Первую группу составили 28 больных с легкой степенью тяжести острого панкреатита. Во вторую группу были включены 22 больных с тяжелым острым панкреатитом. Для оценки степени тяжести состояния больных использовали шкалу Ranson в сопоставлении с клинико-лабораторной семиотикой системной воспалительной реакции и сепсиса. В соответствии с рекомендациями Согласительной конференции [4] состояние больного острым панкреатитом расценивали как тяжелое при значениях шкалы Ranson не менее 3 баллов. Средний балл больных обеих групп по шкале Ranson составил $5,6 \pm 1,9$ балла.

Инфракрасный спектрометрический анализ сыворотки крови проводили по оригинальной методике, разработанной заведующим кафедрой общей химии НГМА, д.х.н., проф. А.С. Гордцевым. В качестве субстрата для исследования использовали сыворотку крови, приготовленную для проведения спектрального анализа. Последнюю высушивали на полуприкрытой чашке Петри, сухой остаток вводили в вазелиновое масло и получали суспензию, которую затем подвергали ИКС на спектрофотометре с регистрацией спектров поглощения в области $1200-1000 \text{ см}^{-1}$. При получении спектрограммы определяли высоту пиков полос поглощения с максимумами при 1180, 1170, 1165, 1160, 1150, 1140, 1130, 1125, 1105, 1100, 1080, 1070, 1060, 1050, 1040, 1025 см^{-1} .

В качестве контрольной группы было обследовано 50 доноров, сопоставимых по полу и возрасту с больными. Показатели ИК-спектров у лиц контрольной группы были приняты за референтные для сравнения с показателями больных с острым панкреатитом. По результатам

корреляционного анализа не удалось установить зависимость показателей ИКС от возраста и пола, что позволило оценивать параметры ИКС без их учета.

Статистическая обработка полученных данных проводилась средствами параметрического и непараметрического анализа с использованием компьютерной программы статистической обработки данных «Statistica 99» [9, 10]. Достоверность результатов оценивалась с помощью критерия Фишера при уровне вероятности $p < 0,01$.

Результаты и их обсуждение.

При анализе ИК-спектров сыворотки крови больных первой группы отмечено, что у 14 из 16 параметров среднее арифметическое отклоняется от среднего арифметического однотипного референтного показателя в сторону уменьшения, а для 2 других коэффициентов характерно увеличение его по сравнению со значениями у лиц контрольной группы (таб.). Однако достоверное различие выявлено лишь для показателей 1170, 1165, 1125, 1105, 1100, 1070, 1060, 1050, 1025 с уверенностью превышающее 99%, т. е. доверительная вероятность равна 0,99, а уровень значимости $p < 0,01$.

Анализ ИК-спектров сыворотки крови больных тяжелым острым панкреатитом выявил уменьшение среднего арифметического по сравнению со средним арифметическим однотипного референтного показателя у 12 из 16 параметров, а для 4 других коэффициентов характерно увеличение его по сравнению со значениями у лиц контрольной группы (таб.). Однако, достоверным оказалось лишь уменьшение показателей 1170, 1165, 1130, 1125 ($p < 0,01$).

При этом, как видно из таблицы 1, показатели 1170, 1165, 1125 при утяжелении состояния больного острым панкреатитом имеют тенденцию к снижению, в сравнении с нормой. Однако, выявленные различия между средними арифметическими этих показателей, оказались недостоверны ($p < 0,05$), что позволяет охарактеризовать данные показатели как маркеры “повреждения” поджелудочной железы независимо от степени его тяжести. В тоже время отмечается достоверное по сравнению с нормой снижение показателей 1105, 1100, 1070, 1060, 1050, 1025 исключительно у больных первой группы. Данный факт позволяет считать вышеуказанные показатели маркерами легкого течения острого панкреатита. Анализ показателей ИКС второй группы позволил, помимо выявления маркеров “повреждения” поджелудочной железы, определить достоверное по сравнению с нормой уменьшение показателя 1130, что позволяет считать его маркером тяжелого течения острого панкреатита.

Приведенные данные результируются в виде спектрограмм больных острым панкреатитом легкой и тяжелой степеней тяжести, а также лиц контрольной группы (Рис.).

При проведении корреляционного анализа рассматриваемых параметров ИКС удалось установить сильную отрицательную корреляцию между значениями показателей 1170, 1165, 1125 больных острым панкреатитом и значениями шкалы Ranson ($r = -0,75$).

В дальнейшем, на основе спектрального анализа сыворотки крови, с использованием соответствующих формул, были вычислены ряд дифференциально - диагностических тестов, причём этим тестам была задана 100% специфичность.

Тест **норма - острый панкреатит** имеет следующий вид: острый панкреатит, независимо от степени его тяжести, имеет место при значениях показателей $1170 < 2,0$; $1165 < 4,6$; $1125 < 3,5$. При этом чувствительность теста составила 89% при использовании всех 3 критериев (Рис.).

Дифференциально - диагностический тест **легкий панкреатит - тяжелый панкреатит**: $1105 > 1,9$; $1100 > 2,2$; $1070 > 4,3$; $1060 > 4,0$; $1050 > 4,7$; $1025 > 4,6$. При данных числовых значениях у больного имеется тяжелый острый панкреатит, чувствительность теста - 87% при использовании не менее 3 критериев (Рис.).

Помимо этого, при сопоставлении спектрограмм в норме, при легком и тяжелом панкреатите, обращает на себя внимание определенная идентичность значений показателей 1105, 1100, 1070, 1060, 1050 и 1025 в норме и при тяжелом панкреатите, и их существенное различие при легком панкреатите (Рис.). Учитывая, что концентрация большинства известных серологических маркеров ОП прямо коррелирует с его тяжестью, выявленная динамика значений показателей 1105, 1100, 1070, 1060, 1050 и 1025 позволяет нам высказать предположение о

Таблица.

Показатели ИК - спектроскопии в норме и при различных степенях тяжести острого панкреатита.

Показатель	Значения ИКС ($M \pm \sigma$)		
	Норма	ЛП	ТП
1180	0,9±0,5	1,0±0,5	0,9±0,6
1170	2,2±0,9	1,3±0,6	0,7±0,3
1165	5,0±1,5	2,0±0,8	1,9±0,8
1160	3,1±1,2	3,2±1,1	3,6±1,2
1150	3,4±1,2	3,1±1,3	4,1±1,1
1140	4,8±1,7	3,6±1,6	3,8±0,8
1130	5,7±1,6	3,4±2,0	2,9±0,6
1125	3,8±1,3	2,1±1,2	2,0±0,7
1105	3,5±1,2	1,0±0,7	3,2±1,3
1100	3,9±1,3	1,1±0,9	3,4±1,8
1080	4,4±1,5	1,5±0,7	4,1±2,0
1070	7,5±2,0	2,7±1,5	6,1±2,2
1060	7,0±2,3	2,6±1,3	6,6±2,5
1050	6,8±2,4	2,6±1,9	6,2±2,7
1040	6,2±2,3	3,0±2,4	6,2±2,5
1025	5,9±2,2	2,7±1,8	5,8±2,6

Примечание: М – среднее арифметическое; σ - стандартное отклонение; ЛП- легкий панкреатит; ТП – тяжелый панкреатит.



Примечание: 1 – спектрограмма в норме; 2 – спектрограмма при остром панкреатите легкой степени тяжести; 3 – спектрограмма при тяжелом остром панкреатите.

Рис. Спектрограмма в норме, при остром панкреатите легкой и тяжелой степени тяжести.

соответствии данных параметров ИКС состоянию перекисного окисления липидов (ПОЛ) и, как следствие, об отражении ими нарушения барьерных свойств липидного слоя биологических мембран. При этом анализ литературных данных показал, что большинство исследователей единодушно высказываются относительно того, что свободно-радикальное окисление имеет значение уже на ранних стадиях развития острого панкреатита. Так, в 1996 г. Т. Ito и соавт. [11], изучая активацию ПОЛ в развитии экспериментального ОП хемилюминесцентным методом, показали, что этот процесс имеет место в развитии ОП и выявляется уже через 1 час в крови, а спустя 2-3 часа - в ткани поджелудочной железы, с постепенным уменьшением активности после 12 часов эксперимента. Уменьшение уровня свечения при развитии тяжелого панкреатита обусловлено нарушением целостности мембран клеток и поступлением в кровь избыточного количества низкомолекулярных полипептидов. Это связано либо с прямым антиоксидантным действием белков и полипептидов, молекулярная масса которых менее 20 000 Д, либо с их способностью изменять состояние инициатора ПОЛ - ионов Fe^{+} [12].

Таким образом, изменение числовых значений и корреляционных связей параметров ИКС при ОП, подтверждает гипотезу об отражении ими уровня нарушения метаболических процессов. В связи с этим, выявленные нами закономерности изменения показателей ИКС при различных формах острого панкреатита, позволяют рекомендовать их для использования в качестве количественных методов ранней диагностики и объективной оценки тяжести состояния больного.

Список литературы

1. Савельев В.С., Филимонов М.И., Гельфанд Б.Р., Бурневич С.З., Орлов Б.Б., Саганов В.П. Клинико-морфологическая характеристика панкреонекроза в свете хирургического лечения. //Анналы хирургии.-2001.- №3.- С. 58-62.
2. Савельев В.С., Гельфанд Б.Р., Филимонов М.И., Бурневич С.З., Орлов Б.Б., Цыденжапов Е.Ц. Комплексное лечение панкреонекроза. Анналы хирургической гепатологии. – 2000. - №2.- С. 61-67.
3. Wilson P.G., Manji M., Neoptolemos J.P. Acute pancreatitis as a model of sepsis. // J. Antimicrob. Chemoter. – 1998. – 41 (suppl A). – p. 51-63.
4. Dervenis C.D., Johnson C.D., Bassi C. Diagnosis, objective assessment of severity and management of acute pancreatitis. Santorini Consensus Conference. // Inter. J. Pancreatology. – 1999. – 25(3). – p. 195-210.
5. Филимонов М.И., Гельфанд Б.Р., Бурневич С.З., Орлов Б.Б., Цыденжапов Е.Ц. Острый панкреатит. Пособие для врачей (под редакцией академика РАН и РАМН В.С. Савельева) – М., 2000.- С.59.
6. Bradley E.L.III. A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the international symposium on acute pancreatitis, Atlanta, Ga, september 11-13, 1992. – p. 586-590.
7. Толстой А.Д., Панов В.П., Красногоров В.Б., Вашетко Р.В., Скородумов А.В. Парапанкреатит. СПб., 2003. - 256с.
8. Багненко С.Ф., Рухляда Н.В., Толстой А.Д., Гольцов В.Р. Лечение острого панкреатита на ранней стадии заболевания. СПб, 2002. 24 с.
9. Беллман Р. Математические методы в медицине. Пер с англ. – М.: Мир, 1987. – 200с.
10. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. – М.: Медицина, 1978. – 296 с.
11. Ito T., Nakao A., Kishimoto W. Participation and sources of active oxygen in experimentally induced acute pancreatitis // Pancreas. - 1996. - V. 2 (2). - P. 173-177.
12. Саразов М.П. Значение перекисного окисления липидов и антиоксидантных систем в развитии панкреатитов: Дисс. ...канд. мед. наук. / СПб.-1998.-116 с.