

На правах рукописи

ЗАГОРОДСКИХ
Елена Борисовна

**ПОКАЗАТЕЛИ ПОВРЕЖДЕНИЯ ЭНДОТЕЛИЯ И ХИРУРГИЧЕСКАЯ
ТАКТИКА ПРИ ОСТРОМ ПАНКРЕАТИТЕ ТЯЖЕЛОГО ТЕЧЕНИЯ**

14.01.17 – Хирургия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Пермь 2014

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Пермская государственная медицинская академия имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель: Черкасов Владимир Аристархович
доктор медицинских наук, профессор.

Официальные оппоненты:

Прудков Михаил Иосифович - доктор медицинских наук, профессор заведующий кафедрой хирургических болезней ФПК и ПП ГБОУ ВПО «Уральского государственного медицинского университета» Минздрава России, г. Екатеринбург.

Стяжкина Светлана Николаевна - доктор медицинских наук, профессор кафедры факультетской хирургии ГБОУ ВПО «Ижевской государственной медицинской академии» Минздрава России г. Ижевск.

Ведущая организация:

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. ак. И.П. Павлова» Минздрава России.

Защита состоится «25 декабря 2014 г. в 9⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 208.067.03 при ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им.ак. Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации (614990, г.Пермь, ул. Петропавловская, 26).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВПО «ПГМА им.ак. Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации (614990, г.Пермь, ул. Петропавловская, 26), с авторефератом на сайте академии: www.psm.ru и www.vak.ed.gov.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор *Малютина Наталья Николаевна*

ВВЕДЕНИЕ

Деструкция и некроз ткани железы возникают в 15-30% случаев острого панкреатита [Дарвин В.В., 2009]. Патологические изменения могут быть различной величины: от мелких участков интерстициального отека, до обширных очагов некроза железы и перипанкреатических тканей [Затевахин И.И. 2007]. Такие случаи объединяются понятием острый панкреатит тяжелого течения (ОПТТ) (классификация Атланта 1992г, пересмотр 2012г) [Савельев В.С., 2000, Sarr 2013].

Высокая летальность при этой патологии (до 30%) обусловлена развитием септических осложнений (СО) [Гостищев В.К., 2003, Брискин С.С., 2001]. Крупные очаги ишемии и некроза железы вызывают чрезмерную активацию цитокиновой сети, и системную воспалительную реакцию (СВР), определяющую вторичную диссеминацию возбудителей и генерализацию инфекции [Козлов В.К., 2007, Савельев В.С., 2006]. Один из путей снижения летальности при таких состояниях видится в улучшении методик своевременной оценки тяжести состояния при остром панкреатите и в поиске способов контроля над эффективностью лечебных мероприятий [Лутфарахманов И.И., 2007].

Остается актуальной проблема оценки эффективности стартовой терапии и прогнозирования развития септических осложнений в первые дни заболевания (1-я неделя) и в конце 2-й в начале 3-й недели течения панкреатита, когда ухудшение состояния связано с инфицированием очагов некроза [Литвин А.А., 2009]. Предложены множество предикторов тяжести течения панкреатита – это секреты поджелудочной железы, цитокины, другие медиаторы и ферменты организма, множество интегральных шкал оценки состояния, но все они имеют недостатки и не отвечают потребностям клиницистов [Литвин А.А., 2009, Кукош М.В., 2003]. Один из путей снижения летальности при таких состояниях видится в улучшении методик своевременной оценки тяжести состояния при остром панкреатите и в поиске способов контроля над эффективностью лечебных мероприятий [Лутфарахманов И.И., 2007, Petrov M.S., 2010].

Тяжесть системной воспалительной реакции определяется функциональным состоянием эндотелия. Активация эндотелиальных клеток и их повреждение провоспалительными цитокинами приводит к усилению внутрисосудистого свертывания и к угнетению фибринолиза, что имеет прямое отношение к развитию полиорганной дисфункции [Черешнев В.А., 2004, Афонасьева А.Н., 2007]. Своевременная оценка состояния эндотелия при остром панкреатите тяжелого течения может быть полезна для оценки состояния больного, качества регенераторного компонента воспаления и эффективности проводимого лечения [Петухов В.А., 2005].

Сохраняются разногласия по поводу хирургической тактики, видов и сроков оперативных вмешательств [Затевахин И.И. 2007, Зайнутдинов А.М. 2008]. По классическим представлениям инфицирование очагов некроза и соответственно гнойно-септические осложнения развиваются к концу 2-й недели, к началу 3-й, тогда же начинают формироваться секвестры некротизированной ткани железы и окружающей клетчатки [Багненко С.Ф.,

2004, Прудков М.И., 2012, Götzinger P., 2003]. Пациенты, оперированные в эти сроки, имеют значимо лучшие результаты [Götzinger P., 2003], но выжидание отграничения очагов некроза нередко приводит к утяжелению сепсиса и полиорганной недостаточности (ПОН). Оперативное вмешательство в этих условиях может усугубить тяжесть состояния [Савельев В.С., 2006, Hartwig P., 2002, Зайнутдинов А.М., 2008]. С другой стороны при обширном некрозе инфицирование девитализированных тканей развивается быстрее, на 1-й, 2-й неделях заболевания [Савельев В.С., 2006, Филимонов М.И. 2004]. В таких случаях представляется целесообразным вмешательство в более ранние сроки с целью снижения эндотоксикоза и предотвращения развития полиорганной недостаточности [Зайнутдинов А.М., 2008]. Для дифференцированного подхода к хирургической тактике предложены комплексы диагностических мероприятий, включающие визуализирующие методики, серологические маркеры, интегральные шкалы оценки тяжести состояния [Савельев В.С., 2006]. Показатели разных методов при этом могут быть противоречивыми, малоинформативными.

Для решения этих задач будет полезна ранняя оценка качества воспалительно-репаративного процесса с помощью маркеров эндотелиальной дисфункции при остром панкреатите тяжелого течения.

Цель исследования

Совершенствование комплексной оценки тяжести состояния, прогнозирования осложнений и выбора хирургической тактики при остром панкреатите тяжелого течения с учётом показателей эндотелиальной дисфункции.

Основные задачи исследования

1. Оценить возможность прогнозирования развития септических осложнений и продолженного некроза поджелудочной железы путем однократного исследования показателей повреждения эндотелия при остром панкреатите тяжелого течения.

2. Оценить информативность мониторинга тяжести состояния и эффективности проводимого лечения при остром панкреатите тяжелого течения с помощью маркеров эндотелиальной дисфункции.

3. Обосновать выбор хирургической тактики при остром панкреатите тяжелого течения по результатам исследований маркеров повреждения эндотелия.

4. Выявить наличие генетической предрасположенности к септическим осложнениям при остром панкреатите тяжелого течения по полиморфизму G849T гена эндотелиальной синтазы оксида азота.

Положения, выносимые на защиту:

1. Состояние пациентов с острым панкреатитом тяжелого течения в первые 4 недели заболевания можно контролировать путем определения уровня васкулярного эндотелиального фактора роста (ВЭФР) сыворотки крови. Повышение концентрации этого фактора роста в сыворотке крови

свидетельствует о снижении тяжести состояния пациента и эффективности проводимого лечения.

2. О благоприятном исходе острого панкреатита тяжелого течения свидетельствует снижение количества десквамированных эндотелиоцитов(ДЭЦ) в период первых 2-х недель от начала заболевания.

3. Признаком неблагоприятного прогноза септических осложнений при остром панкреатите тяжелого течения при выбранной лечебной тактике служит снижение уровня васкулярного эндотелиального фактора роста или отсутствие его повышения.

4. Сроки и вид оперативного лечения можно скоординировать путем динамического исследования уровня васкулярного эндотелиального фактора роста в сыворотке крови, который свидетельствует о формировании ограничительного барьера вокруг очагов некроза в железе и в окружающих тканях.

Научная новизна работы

Установлено, у больных острым панкреатитом тяжелого течения уровень васкулярного эндотелиального фактора роста и количество десквамированных эндотелиоцитов достоверно выше, чем у здоровых людей. Между группой больных без септических осложнений и группой с септическими осложнениями не выявлено достоверных различий по уровню васкулярного эндотелиального фактора роста и количеству десквамированных эндотелиоцитов при однократном исследовании в первые 10 суток от начала заболевания.

У пациентов с благоприятным течением острого панкреатита тяжелого течения выявлена прямая достоверная взаимосвязь уровня васкулярного эндотелиального фактора роста и времени от начала заболевания. Прогрессивное повышение концентрации этого фактора является признаком снижения тяжести состояния и регресса септических осложнений в первые 4 недели заболевания.

Выявлена обратная взаимосвязь тяжести системной воспалительной реакции и уровня васкулярного эндотелиального фактора роста в сыворотке крови у больных острым панкреатитом тяжелого течения с септическими осложнениями в динамике. Операционные характеристики определения уровня васкулярного эндотелиального фактора роста сыворотки крови, как способа прогноза исхода абдоминального сепсиса при остром панкреатите тяжелого течения составили: чувствительность - 79,1%, специфичность - 72,7%. Метод определения динамики изменения уровня васкулярного эндотелиального фактора роста предложен, как точный и простой способ прогнозирования исхода абдоминального сепсиса, патент на изобретение № - 2517523, опубликован 27.05.14г., бюллетень №15.

У пациентов с благоприятным течением острого панкреатита установлена обратная взаимосвязь количества десквамированных эндотелиоцитов со временем прошедшим от начала заболевания. Количество десквамированных эндотелиоцитов снижается в период со 2 по 19 сутки от начала заболевания.

При остром панкреатите тяжелого течения выявлена прямая достоверная связь отграничения очагов некроза и уровня васкулярного эндотелиального

фактора роста сыворотки крови. Установлены операционные характеристики определения уровня васкулярного эндотелиального фактора роста для оценки процессов отграничения очагов некроза: чувствительность – 87,5%, специфичность – 81,8%.

По материалам исследования полиморфизм G849T гена эндотелиальной синтазы оксида азота (*NOS3*) можно рассматривать, как фактор, влияющий на развитие септических осложнений при остром панкреатите тяжелого течения. Для получения статистически значимых различий необходимо большее число обследованных.

Практическая значимость

При оценке тяжести состояния пациентов с острым панкреатитом тяжелого течения исследование васкулярного эндотелиального фактора роста в динамике позволяет своевременно судить о прогрессировании эндотоксикоза и развитии септических осложнений, а также корректировать проводимую терапию.

Такой показатель, как количество десквамированных эндотелиоцитов доступен определению в условиях районного стационара. Подтверждено, что отсутствие снижения количества десквамированных эндотелиоцитов в динамике свидетельствует о прогрессировании некроза и необходимости перевода пациента в специализированный стационар.

Для оценки тяжести системной воспалительной реакции и эффективности лечебных мероприятий предложено определять уровень васкулярного эндотелиального фактора роста у больных острым панкреатитом тяжелого течения с септическими осложнениями в динамике. Снижение концентрации этого показателя будет свидетельствовать об утяжелении состояния и развитии полиорганной недостаточности, и будет служить неблагоприятным прогностическим фактором. На основании этих данных предложен способ прогноза исхода сепсиса при остром панкреатите тяжелого течения.

При выборе срока оперативного вмешательства рекомендовано ориентироваться на динамику изменения уровня васкулярного эндотелиального фактора роста. Установлено, что нарастание уровня васкулярного эндотелиального фактора роста в сыворотке крови свидетельствует о формировании ограничительного барьера вокруг очагов некроза, и позволяет обоснованно отложить оперативное лечение до стабилизации функций всех органов и систем, с последующим применением малоинвазивных методик хирургического лечения. Снижение концентрации этого фактора в сыворотке крови указывает на расширение зон некроза и нарастание тяжести сепсиса и полиорганной недостаточности, обосновывая необходимость в санационном вмешательстве.

Внедрение результатов исследования

Практические рекомендации по применению маркеров повреждения эндотелия для прогнозирования исхода сепсиса, для мониторинга состояния больных острым панкреатитом тяжелого течения и для определения хирургической тактики внедрены в работу 2-го хирургического отделения

Пермской краевой клинической больницы (ПККБ). Результаты диссертационной работы используются в учебном процессе на кафедре госпитальной хирургии, на кафедре ФПК и ППС для преподавания студентам 5-6 курсов, интернам, ординаторам и врачам-хирургам.

Связь работы с научными программами

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом НИР ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, номер государственной регистрации темы 01200800815.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на научной сессии ГОУ ВПО ПГМА им. ак. Е.А. Вагнера Минздрава России (Пермь, 2012), на XIX международном Конгрессе хирургов-гепатологов России и стран СНГ «Актуальные вопросы хирургической гепатологии» (Иркутск 2012), на совместном заседании научно-координационного совета по хирургии ГБОУ ВПО ПГМА им. ак. Е.А. Вагнера Минздрава России № 23 от 19.05.2014г.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 3 печатных работы в рецензируемых журналах рекомендованных ВАК РФ. Оформлены патент «способ прогноза исхода сепсиса» № - 2517523, опубликован 27.05.14г., бюллетень №15, и рационализаторское предложение № - 2611 от 20.03.2013г.

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации

Автор осуществляла курацию всех больных, вошедших в исследование, участвовала в 75% операций в качестве ассистента, производила подсчет количества дасквамированных эндотелиоцитов, подготовила публикации по теме диссертации. Самостоятельно выполнила статистическую обработку и анализ полученных данных.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 119 страницах машинописного текста и состоит из введения, 6 глав, обсуждения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и приложений. Текст иллюстрирован 26 таблицами, 24 рисунками. Библиографический список содержит 149 наименований, из них 56 отечественных и 93 иностранных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на кафедре госпитальной хирургии Пермской государственной медицинской академии им. ак. Е.А. Вагнера Минздрава России на базе II хирургического отделения Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Пермского края «Ордена «Знак почета» Пермской Краевой клинической больницы (ПККБ).

Проведено динамическое пассивное проспективное исследование больных ОПТТ, находившихся на лечении в клинике с января 2011 года по октябрь 2012

года. Большая часть пациентов поступала в клинику после оказания медицинской помощи в стационарах районных центров Пермского края, меньшую часть госпитализировали из районов города по скорой помощи. Отбор пациентов для исследования проводился в соответствии с классификацией острого панкреатита (Атланта 1992г) и с пересмотром этой классификации от 2012г, исключались пациенты с отечной формой панкреатита, обозначенной в классификации mild [Савельев В.С., 2000, Sarr M.G., 2013].

Обследовано 42 пациента с острым панкреатитом тяжелого течения (ОП) находившихся на лечении в ГУЗ Пермской краевой клинической больнице в 2011-2012 годах, из них 26 – мужчины (66,6%), 13 – женщины (33,3%). Возраст больных был от 19 до 82 лет, $47,2 \pm 15,6$ лет. В исследуемой группе больных (n=42) летальный исход был у 5 пациентов (11,9%). Пациенты основной группы (n=42) поступали в стационар через $5,38 \pm 9,09$ суток от начала заболевания больные, вошедшие в динамическое исследование показателей эндотелиальной дисфункции (n=33), поступали через $4,18 \pm 3,03$ суток. В качестве группы сравнения при исследовании показателей эндотелиальной дисфункции, выбраны 13 практически здоровых людей проходивших ежегодный профилактический осмотр на базе НУЗ «ОКБ на ст. Пермь II ОАО «РЖД», из них 7 мужчин (53,8%) и 6 женщин (46,2%).

Больные острым панкреатитом тяжелого течения были разделены на 2 группы: в первую включены пациенты без СО (n=18), во вторую - с СО (n=24). При формировании групп наблюдения применялся метод адаптивной рандомизации.

Пациенты основной группы (n=42) поступали в стационар через $5,38 \pm 9,09$ суток от начала заболевания больные, вошедшие в динамическое исследование показателей эндотелиальной дисфункции (n=33), поступали через $4,18 \pm 3,03$ суток.

Диагноз абдоминального сепсиса устанавливали согласно критериям предложенным в практическом руководстве под редакцией В.С. Савельева и Б.Е. Гельфанда [Савельев В.С., 2006]. Выраженность клинических синдромов абдоминального сепсиса оценивали на основании характеристик, предложенных Б.Е. Гельфандом в 1999 г [Савельев В.С., 1999]. В сторону утяжеления системной воспалительной реакции (СВР) выделялись следующие синдромы: сепсис - SIRS3 – наличие 3-х симптомов СВР, сепсис – SIRS4 – наличие 4-х симптомов СВР, тяжелый сепсис, септический шок [Савельев В.С., 2006]. Для удобства статистической обработки мы предложили балльную оценку клинических синдромов СВР: наличие 2 и менее критериев СВР – 1 балл, наличие 3 критериев СВР - 2 балла, наличие 4 критериев СВР -3 балла, тяжелый сепсис – 4 балла, септический шок -5 баллов (рационализаторское предложение №2611 от 20.03.2013г.).

У пациентов основной группы в большинстве случаев (59,5%) была токсическая (этаноловая) этиология острого панкреатита, в 28,6% случаях - билиогенная этиология, в 4,8% случаев панкреатит развился в результате травм, в 7% этиология осталась не ясна.

В исследование генотипов гена *NOS3* из 42 включены 39 пациентов с ОПТТ. Из 39 обследованных 26 были мужчины (66,6%), 13 – женщины (33,3%). Средний возраст больных составил $48,05 \pm 15,84$ лет. В качестве группы сравнения при исследовании *NOS3* выбраны 80 практически здоровых пациентов, проходивших ежегодный профилактический осмотр на базе НУЗ «ОКБ на ст. Пермь II ОАО «РЖД». Из них 42 мужчины (52,5%) и 38 женщин (47,5%). Средний возраст обследуемых в этой группе составил $44,65 \pm 9,92$ лет. Контрольная группа сопоставима с исследуемой по полу (точный критерий Фишера двусторонний $p = 0,16$).

Методы исследований. Всем пациентам основной группы при поступлении проводили: сбор жалоб, анамнеза, физикальное обследование; общеклинические лабораторные методы исследования: общий анализ крови, общий анализ мочи, биохимический анализ крови с определением уровня общего белка и альбумина, глюкозы, трансаминаз, креатинина, мочевины, билирубина, амилазы, С-реактивного белка, электролитов – Na^+ , K^+ , Ca^{2+} . Газовый состав крови определяли с помощью газоанализатора Easy Stat REF 7101. Исследовали уровень прокальцитонина (ПКТ) в крови с помощью полуколичественного иммунохроматографического экспресс-теста BRAHMS PCT-Q.

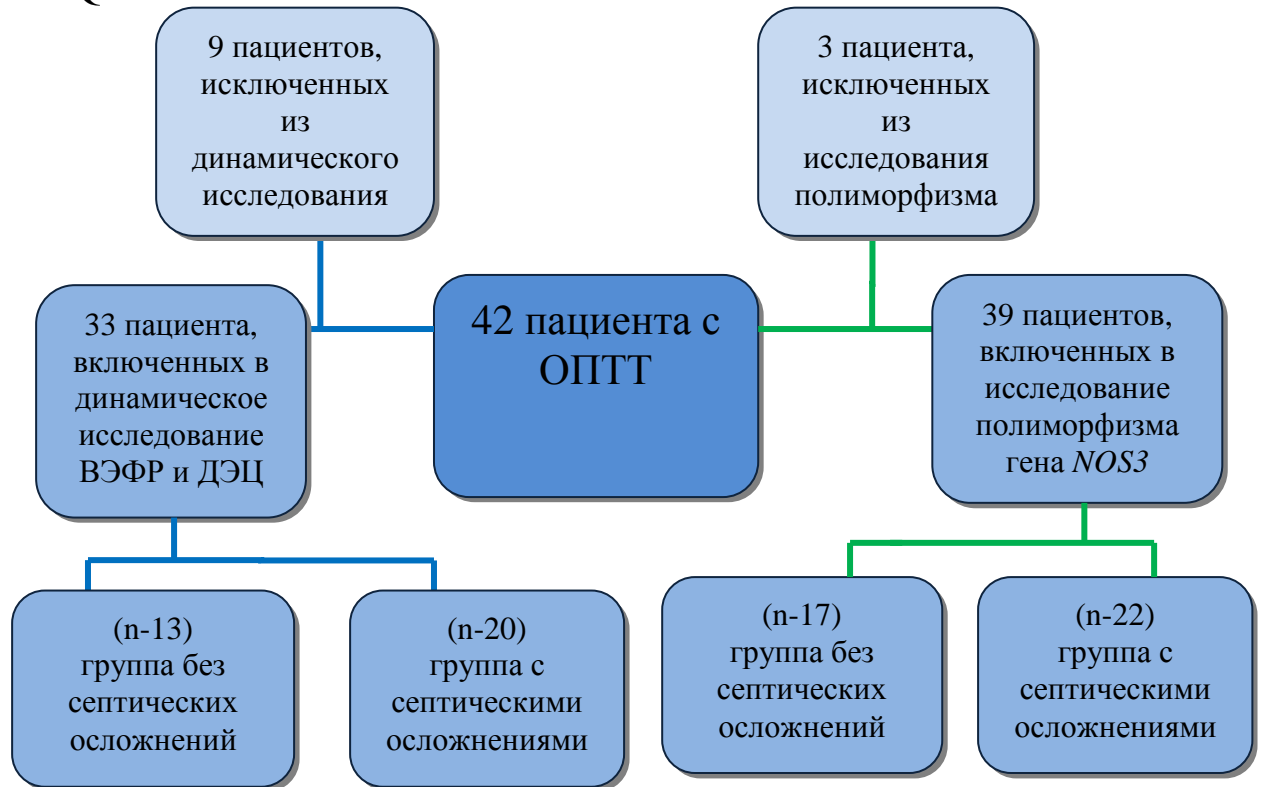


Рис. 1. Дизайн исследования

Инструментальное обследование: выполняли рентгенографию грудной клетки, области живота, электрокардиографию (ЭКГ), ультразвуковое исследование (УЗИ) органов брюшной полости и компьютерную томографию (КТ) органов брюшной полости.

Количественное определение ВЭФР в плазме крови выполняли с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов «VEGF – ИФА - Бест» ЗАО «Вектор-Бест» (Россия). Тест основан на «sandwich» методе твердофазного ИФА с применением моно- и поликлональных антител к ВЭФР человека. Концентрация ВЭФР в исследуемом материале определяется по величине оптической плотности образцов с помощью спектрофотометра вертикального сканирования. Измерение оптической плотности проводилось при длине волны 450 нм, расчет количества ВЭФР проводили в пг/мл.

Подсчет количества ДЭЦ. Метод подсчета ДЭЦ в плазме крови предложен Hladovec в 1978г [Петрищев Н.Н. 2001]. Принцип метода основан на отделении эндотелиоцитов вместе с тромбоцитами и последующем осаждении тромбоцитов аденозиндифосфатом (АДФ). Подсчет ДЭЦ производили в камере Горяева. С учетом объема камеры Горяева, объема полученной суспензии и объема плазмы при подсчете эндотелиальных клеток полученный результат умножали на $10^4/л$.

Полиморфизм *NOS3* исследовали на приборе «ДТ96» с помощью набора «ДНК-технология» (Москва). Набор предназначен для определения полиморфизмов в геноме человека методом плавления аллель-специфичных сигнальных проб.

Результаты исследований обработаны при помощи пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft, USA). Для описания полученных количественных признаков использовались среднее арифметическое (M) и среднее квадратичное отклонение (σ). Для проверки значимости различий применялись непараметрические критерии Манна-Уитни, Вилкоксона. Связь признаков оценивалась при помощи регрессионного анализа с определением коэффициента ранговой корреляции Спирмена (R) и 95% доверительного интервала (CI). Сравнение групп больных по качественным признакам выполняли с помощью: критерия Пирсона, χ^2 , точного критерия Фишера. Различия между выборками считались статистически достоверными при значении для $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Однократное исследование маркеров повреждения эндотелия в первые 10 дней было выполнено 42 пациентам. Они были разделены на 2 группы: группу без СО (n=18) находились в стационаре $11,5 \pm 6,7$ суток, поступали через $3,83 \pm 2,85$ суток от начала заболевания и группу с СО (n=24), находились в стационаре $33,0 \pm 28,8$ суток. Тяжесть состояния пациентов с ОПТТ в двух группах оценивали с применением традиционных клинических и лабораторных методов (таб.1).

Таблица 1. Лабораторные и клинические показатели тяжести состояния больных ОПТТ.

Показатели	Группа ОПТТ (n=42)	Группа без СО (n=18)	Группа с СО (n=24)	P (U - тест)
SAPS II (баллы)	23,43±12,41	15,94±7,36	29,25±13,36	0,001
Тяжесть СВР (баллы)	2,38±1,88	0,55±0,70	3,87±1,11	0,0001

Полуколичественный ПКТ-тест (нг/мл)	4,26±4,24	0,20±0,27	4,53±4,26	0,002
С реактивный белок (мг/л)	227,41±167,01	195,4±123,9	255,9±183,6	0,33

Результаты исследования уровня ВЭФР в сыворотке крови и количества ДЭЦ в плазме крови у пациентов с ОПТТ в 1 исследовании при поступлении представлены в таблице 2.

Таблица 2. Уровни ВЭФР в сыворотке крови и ДЭЦ у больных ОПТТ при поступлении.

Показатели	Группа сравнения (n=13)	Группа ОПТТ(n=42)		Группа без СО (n=18)		Группа с СО (n=24)		P ₄
		M±σ	p ₁	M±σ	p ₂	M±σ	p ₃	
ВЭФР (нг/мл)	144,7±97,7	517,2±619,3	0,0002	668,7±852,8	0,046	498,0±364,9	0,0001	0,44
ДЭЦ (10 ⁴ /л)	3,02±1,2	17,4±11,8	0,0001	16,9±8,9	0,0001	17,7±13,7	0,0005	0,89

Примечание. p₁ – значимость отличий между группами сравнения и больных ОПТТ; p₂ – значимость отличий между группами сравнения и больных ОПТТ без СО; p₃ – значимость отличий между группами сравнения и больных ОПТТ с СО; p₄ – значимость отличий в группах больных ОПТТ с СО и без СО.

Уровень ВЭФР и количество ДЭЦ у больных ОПТТ в обеих группах достоверно выше, чем у здоровых людей. Достоверной разницы между группой с СО и группой без СО в показателях ВЭФР и ДЭЦ в первые 10 суток от начала заболевания не выявлено. Выявлена прямая корреляционная связь средней силы между двумя маркерами повреждения эндотелия ВЭФР и ДЭЦ: метод Спирмена r=0,342, p=0,026.

Достоверной разницы в уровне ВЭФР в первые 10 суток между группой умерших и группой без СО не выявлено (U-тест p=0.638), и между группой умерших и выжившими в группе с СО её также не установлено (U-тест p=0.679). По количеству ДЭЦ в первые 10 суток группа умерших от группы без СО и выживших группы с СО не выявлено (U-тест p=0.91 и p=0.83 соответственно). Таким образом, при однократном исследовании прогностического значения показателей повреждения эндотелия в начальный период заболевания не установлено.

Исследование маркеров эндотелиальной дисфункции в динамике проведено у 33 пациентов с ОПТТ, они были разделены на две группы: в группу без СО включены 13 больных (n=13), в группу с СО вошли 20 пациентов (n=20).

Группа без СО. По результатам исследования количества ДЭЦ в динамике в группе без СО выделено 2 подгруппы. В 1 подгруппу включены 8 пациентов, у которых за время наблюдения количество ДЭЦ уменьшилось с

21,50±10,78×10⁴/л в 1 исследовании до 11,35±7,81×10⁴/л во втором (Wilcoxon тест p=0,0117). Во 2 подгруппу включены 5 пациентов, у которых за наблюдаемый период количество ДЭЦ увеличилось с 14,42±5,21×10⁴/л до 19,20±5,21×10⁴/л, (Wilcoxon тест p=0,043) (рис.1).

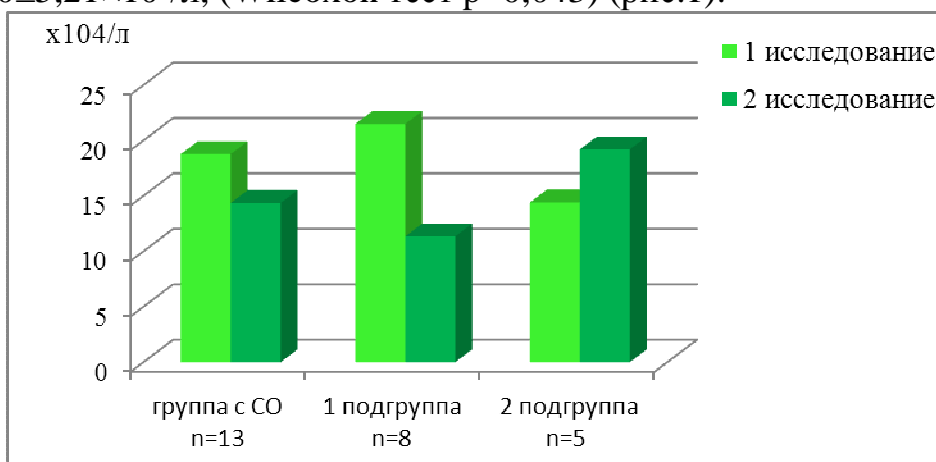


Рис.1. Динамика изменений количества ДЭЦ у больных группы без СО.

По результатам исследования ВЭФР в динамике в группе без СО также выделено две подгруппы. В 1 подгруппу включены 9 больных, у которых за наблюдаемый период времени (7суток) уровень ВЭФР в сыворотке крови повысился с 331,43±305,91 пг/мл до 796,72±366,74 пг/мл, (Wilcoxon тест p = 0,007) (рис. 2).

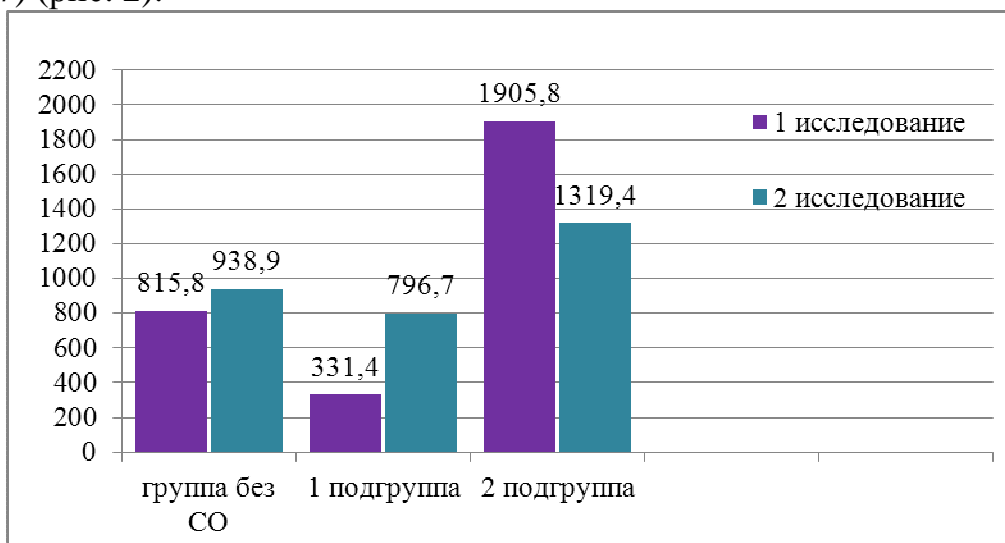


Рис. 2. Динамика изменений уровня ВЭФР у пациентов группы без СО.

Во 2 подгруппу вошли четверо больных, у которых при первом исследовании выявлен высокий уровень ВЭФР – 1905,85±818,08 пг/мл, через 7 дней у всех он снизился до 1319,4±564,9 пг/мл, (Wilcoxon тест p = 0,067), но был выше, чем в 1 подгруппе при втором исследовании. Отличие в динамике изменений уровня сывороточного ВЭФР в подгруппах можно объяснить временем взятия проб от начала заболевания. В 1 подгруппе 1 исследование проведено в основном в первые 7 суток от начала заболевания, за исключением 2 случаев на 8 и 9 сутки. В этот период времени во 2 подгруппе наблюдался разгар клинических проявлений панкреатита, что подтверждается тяжестью

состояния по SAPS II. Уровень ВЭФР в 3 случаях из 4 превышал 2000 пг/мл. К моменту взятия последующей пробы у этих пациентов наступил некоторый регресс клинической симптоматики, и уровень ВЭФР сыворотки снизился по сравнению с 1 исследованием, но в целом остался выше, чем в 1 подгруппе.

Выполнен линейный регрессионный анализ зависимости уровня ВЭФР от времени проведения исследования: проанализировано 26 случаев, бета=0,408, стандартная ошибка бета=0,186, $p=0,038$. Таким образом, в период заболевания со 2 по 17 сутки уровень ВЭФР в сыворотке крови зависит от времени взятия пробы в группе больных ОПГТ без СО.

При исследовании динамики изменений уровней ВЭФР сыворотки крови у пациентов группы без СО выявлено, что нарастание этого маркера развивается к 7 - 14 дням заболевания. В дальнейшем, он может незначительно снижаться, но остается намного выше нормы на фоне отсутствия у пациентов прогрессирования деструкции поджелудочной железы и гнойно-септических осложнений.

Группа с СО. Пациенты группы с СО ($n=20$), находились в стационаре $36,8 \pm 29,9$ суток. Они были госпитализированы в ПККБ через $4,13 \pm 3,52$ суток от начала заболевания.

По результатам исследования количества ДЭЦ в динамике в группе с СО выделено 2 подгруппы. В 1 подгруппу включены 7 пациентов, у которых за время наблюдения количество ДЭЦ уменьшилось с $25,57 \pm 22,59 \times 10^4/\text{л}$ в 1 исследовании до $7,62 \pm 4,77 \times 10^4/\text{л}$ во втором (Wilcoxon тест $p=0,017$). Во 2 подгруппу включены 13 пациентов, у которых за наблюдаемый период количество ДЭЦ увеличилось с $14,53 \pm 7,27 \times 10^4/\text{л}$ при 1 исследовании, до $20,53 \pm 9,87 \times 10^4/\text{л}$ во втором, (Wilcoxon тест $p=0,021$) (рис.3).

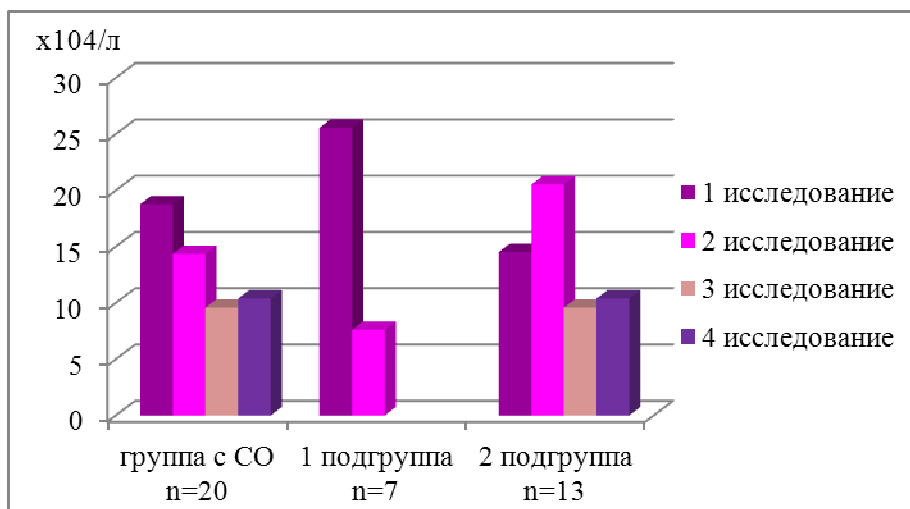


Рис. 3. Динамика изменения количества ДЭЦ у больных группы с СО.

По результатам исследования динамики изменений количества ДЭЦ, удалось установить, что этот показатель повреждения эндотелия достоверно снизился у больных 1 подгруппы наряду с достоверным снижением тяжести СВР ($p=0,017$) и тяжести состояния по SAPS II ($p=0,018$). Срок госпитализации в этой подгруппе составил $19,1 \pm 7,5$ койко дней, что достоверно меньше, чем во 2 подгруппе $46,3 \pm 33,3$ ($p = 0,008$).

Из этого можно сделать вывод, что показатель повреждения эндотелия - количество ДЭЦ - позволил выделить группу пациентов с СО, достоверно отличающуюся от остальных больных с СО, в которой при втором исследовании достоверно снизились тяжесть состояния по SAPS II, тяжесть СВР, и срок госпитализации был достоверно меньшим.

Выявлена достоверная обратная корреляция количества ДЭЦ и времени от начала заболевания у всех пациентов группы без СО и 1 подгруппы с СО: метод Спирмена $R=-0,464$ (95% CI=[-0,171; -0,681]), $p=0,002$. Выполнен линейный регрессионный анализ зависимости количества ДЭЦ от времени от начала заболевания в группе без СО и в 1 подгруппе группы с СО: проанализировано 40 случаев, бета=0,415, стандартная ошибка бета=0,147, $p=0,008$.

Из этого можно сделать вывод, что при благоприятном течении ОПТТ и регрессе СО количество ДЭЦ снижается с течением времени, со 2 по 19 сутки, при прогрессировании некроза железы и гнойно-септических осложнениях эта взаимосвязь не прослеживается.

По результатам исследования уровня ВЭФР сыворотки крови в динамике в группе с СО также выделено две подгруппы.

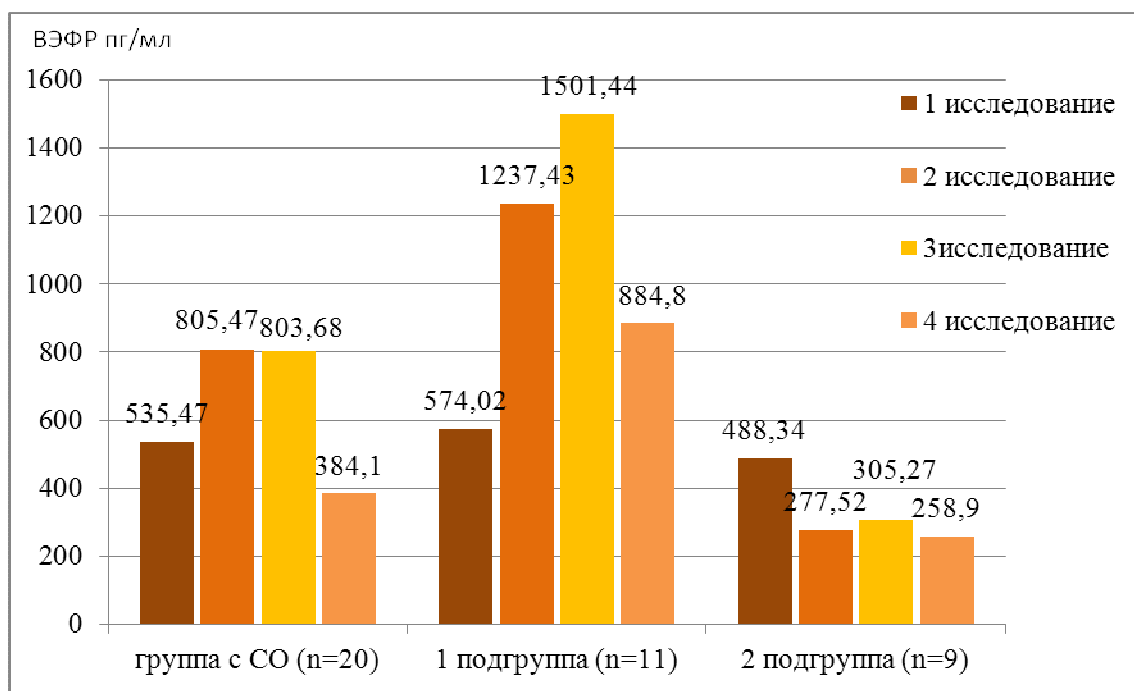


Рис. 4. Динамика изменений уровня ВЭФР в группе с СО.

В 1 подгруппу включены 11 больных, у которых после первого исследования уровень ВЭФР сыворотки крови поднялся с $574,02 \pm 444,88$ пг/мл до $1237,43 \pm 734,11$ пг/мл, (Wilcoxon тест $p=0,003$), при этом достоверно снизилась тяжесть состояния по SAPS II ($p=0,038$) в эти сроки. Тяжесть СВР также уменьшилась в этой подгруппе, но разница с 1 исследованием не достоверна ($p=0,059$).

Во 2 подгруппу включены 9 больных, у которых отмечено снижение уровня ВЭФР плазмы крови с $488,34 \pm 303,39$ пг/мл до $277,52 \pm 171,76$ пг/мл (Wilcoxon тест $p=0,03$).

Проведен корреляционный анализ показателей тяжести состояния, уровня ВЭФР и времени от начала заболевания. Определена прямая достоверная взаимосвязь уровня ВЭФР и времени от начала заболевания у пациентов 1 подгруппы: метод Спирмена $R=0,66$ (95% CI=[0,519; 0,75]), $p=0,0005$. В корреляционный анализ вошли исследования, выполненные с 1 по 32 сутки.

Определена взаимосвязь уровня ВЭФР сыворотки крови и сроков исследования от начала заболевания в группе без СО и в 1 подгруппе с СО, выделенной по результатам ВЭФР: метод Спирмена $R=0,59$ (95% CI=[0,377; 0,742, $p=0,000003$). Во всей группе больных ОПТТ обследованных в динамике ($n=33$) взаимосвязи этих показателей не выявлено: метод Спирмена $R=0,17$, $p=0,1$. Выполнен линейный регрессионный анализ зависимости уровня ВЭФР сыворотки крови от времени от начала заболевания в группе без СО и в 1 подгруппе группы с СО: проанализировано 54 случая, $\beta=0,492$, стандартная ошибка $\beta=0,1207$, $p=0,00015$.

Из этого можно сделать вывод, что у пациентов с ОПТТ без СО и у части больных из группы с СО с прогрессивным улучшением состояния по шкале SAPS II ($p=0,037$), уровень ВЭФР с течением времени возрастает с 1 по 32 сутки.

Проанализирована взаимосвязь между клиническими показателями и маркерами эндотелиальной дисфункции в группе с СО на протяжении динамического исследования. Определена достоверная отрицательная взаимосвязь тяжести СВР и уровня ВЭФР сыворотки крови в группе с СО: метод Спирмена $R=-0,341$ (95% CI=[-0,082; -0,556]), $p=0,009$, и в целом у всех динамически обследованных пациентов с ОПТТ: метод Спирмена $R=-0,296$ (95% CI=[-0,082; -0,483]), $p=0,006$. Сравнение коэффициентов корреляции R_1 – группа с СО и R_2 – вся группа больных ОПТТ в динамическом исследовании: $R_1=-0,341$, $R_2=-0,296$, $N_1=57$, $N_2=83$, $p=0,8$.

Выполнен линейный регрессионный анализ зависимости уровня ВЭФР сыворотки крови от тяжести СВР у пациентов группы с СО: проанализировано 57 случаев, $\beta=0,285$, стандартная ошибка $\beta=0,129$, $p=0,031$. Также выполнен линейный регрессионный анализ зависимости уровня ВЭФР сыворотки крови от тяжести СВР у всех больных ОПТТ, включенных в динамическое исследование. Проанализировано 83 случая, $\beta=0,258$, стандартная ошибка $\beta=0,107$, $p=0,018$. Таким образом, уровень ВЭФР в сыворотке крови зависит от тяжести СВР в группе больных ОПТТ, обследованных в динамике.

Высчитаны операционные характеристики определения уровня ВЭФР, как диагностического теста для определения утяжеления СВР при ОПТТ. Расчет данных представлен в таблице 3.

Таблица 3. Распределение пациентов по динамике изменений уровня ВЭФР сыворотки крови и тяжести СВР.

	Утяжеление СВР (баллы)	Снижение тяжести СВР (баллы)	Всего случаев
Уровень ВЭФР снизился (пг/мл)	8	5	13

Уровень ВЭФР увеличился (пг/мл)	3	19	22
Всего случаев	11	24	35

Чувствительность определения динамики изменения уровня ВЭФР сыворотки крови, как диагностического теста для оценки изменения тяжести СВР при ОПТТ – 79,1%. Специфичность определения динамики изменения уровня ВЭФР сыворотки крови, как диагностического теста для оценки изменения тяжести СВР при ОПТТ – 72,7%. Прогностическая ценность положительного результата – 86,3%, прогностическая ценность отрицательного результата – 61,5%.

Метод определения динамики изменения уровня ВЭФР плазмы крови предложен, как точный и простой способ прогнозирования исхода абдоминального сепсиса, оформлен патент «способ прогноза исхода сепсиса» № - 2517523, опубликован 27.05.14г., бюллетень №15.

Преимуществами предлагаемого способа прогнозирования являются: его упрощение по сравнению с прогностическими шкалами оценки тяжести состояния, из-за уменьшения числа анализируемых критериев с 14 при АРАСНЕ II и 15 при SAPS II до 1, высокая чувствительность предложенного теста – 79,1%, высокая точность результатов за счет применения иммуноферментного теста, низкая себестоимость.

За время наблюдения в стационаре оперированы 30 (71,4%) пациентов из 42 больных ОПТТ, в 12 (28,6%) случаях ограничили консервативным лечением. В группе без СО из 18 человек оперированы 6 (33,3%), в группе с СО оперированы все 24 (100%) пациента, 6 больных оперированы дважды, из них 3 - трижды.

В группе больных ОПТТ без СО включенных в динамическое исследование оперированы 5 пациентов из 13. Достоверных различий показателей повреждения эндотелия у оперированных больных и пациентов группы без СО, в целом, не выявлено.

В группе больных ОПТТ СО включенных в динамическое исследование оперированы все 20 пациентов. У 2 оперированных пациентов острый панкреатит был травматической этиологии. У остальных 18 больных все виды оперативных вмешательств можно разделить на 2 вида: 1 вид - санация брюшной полости, абдоминализация поджелудочной железы, формирование бурсостомы, установка сквозного дренажа сальниковой сумки, 2 вид - удаление секвестрированных участков поджелудочной железы и окружающей клетчатки, формирование бурсостомы, установка сквозного дренажа сальниковой сумки. Показатели повреждения эндотелия и время операций от начала заболевания представлены при каждом из видов вмешательств представлены в таблице 4.

Таблица 4. Уровень ВЭФР и количество ДЭЦ, время от начала заболевания при двух видах вмешательств.

	ВЭФР пг/мл	ДЭЦ $\times 10^4$	Сутки от начала заболевания
1 вид (n = 10)	527,0 \pm 391,2	21,2 \pm 20,4	5,3 \pm 4,05
2 вид (n = 8)	735,9 \pm 531,3	20,3 \pm 7,9	12 \pm 5,3

U - тест	0,408	0,315	0,008*
----------	-------	-------	--------

Примечание. * - отличия достоверны.

У пациентов группы с СО проведен анализ взаимосвязи значений маркеров повреждения эндотелия с наличием секвестрации очагов некроза. Секвестрация очагов некроза оценивалась по интраоперационной картине и по результатам КТ брюшной полости в сроки проведения исследований ($\pm 1-2$ дня). По данным КТ принимались во внимание жидкостные скопления, ограниченные инфильтрированными стенками, с наличием газа. Для анализа взяты 27 случаев, результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5. Корреляционный анализ показателей повреждения эндотелия и наличия секвестрации очагов некроза у больных группы с СО.

	R	p
ВЭФР и секвестрация	0,56	0,002*
ДЭЦ и секвестрация	0,19	0,32

Примечание. * - взаимосвязь достоверна.

Выявлена прямая достоверная связь уровня ВЭФР сыворотки крови и наличия секвестрации очагов некроза в брюшной полости и забрюшинном пространстве: метод Спирмена: $R=0,56$ (95% CI=[0,21; 0,78]), $p=0,002$. С количеством ДЭЦ корреляции не установлено.

Выполнен линейный регрессионный анализ зависимости секвестрации очагов некроза в брюшной полости и в забрюшинном пространстве от уровня ВЭФР: проанализировано 27 случаев, $\beta=0,5004$, стандартная ошибка $\beta=0,173$, $p=0,007$.

Высчитаны операционные характеристики определения уровня ВЭФР, как диагностического теста для определения секвестрации очагов некроза при ОПТТ. Расчет данных представлен в таблице 6.

Таблица 6. Распределение случаев по динамике изменения уровня ВЭФР и наличию секвестрации очагов некроза.

	Случаи без секвестрации очагов	Случаи с секвестрацией	Всего
Уровень ВЭФР снизился (пг/мл)	9	2	11
Уровень ВЭФР увеличился (пг/мл)	2	14	16
Всего	11	16	27

Чувствительность определения уровня ВЭФР сыворотки крови, как диагностического теста для секвестрации некротических тканей при ОПТТ – 87,5%. Специфичность определения уровня ВЭФР сыворотки крови, как диагностического теста для секвестрации некротических тканей при ОПТТ – 81,8%. Прогностическая ценность положительного результата – 87,5%, прогностическая ценность отрицательного результата – 81,8%.

Из полученных результатов можно сделать вывод, что повышение уровня ВЭФР в сыворотке крови при ОПТТ свидетельствует о формировании

ограничительного барьера вокруг очагов некроза в железе и окружающих тканях. При этом уровень подъёма фактора индивидуален у каждого пациента. Допустимо сравнение уровня ВЭФ сыворотки крови с уровнем этого показателя в предыдущем исследовании у этого же пациента. Снижение ВЭФ в сыворотке крови в свою очередь при остром панкреатите тяжелого течения говорит о нарушении регенераторного компонента воспалительной реакции. При этом организм не способен выстроить полноценный ограничительный барьер вокруг очагов деструкции, что приводит к прорыву медиаторов и эндотоксинов из очага воспаления в системный кровоток и вызывает расширение зоны повреждения и утяжеление СВР.

Исследование полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота (NOS3). Полиморфизм *NOS3*, был исследован у 39 пациентов с ОПТТ, из них 26 – мужчины (66,6%), 13 – женщины (33,3%). Средний возраст больных составил $48,05 \pm 15,84$ лет. Больные ОПТТ были разделены на 2 группы: в первую вошли пациенты без СО (n=17), во вторую - с СО (n=22) Распределение генотипов и аллелей *NOS3* в группе сравнения и группе ОПТТ представлено в (таб. 6).

Таблица 7. Распределение аллелей и генотипов *NOS3*(T894G) в группах пациентов.

Группы	Генотипы гена NOS3			аллели	
	GG	GT	TT	G	T
Группа ОПТТ(n-39)	21(53,84%)	16(41,02%)	2(5,13%)	58(74,4%)	20(25,6%)
Группа без СО (n-17)	11(64,7%)	5(29,4%)	1(5,9%)	27(79,5%)	7(20,5%)
Группа с СО (n-22)	10(45,45%)	11(50%)	1(4,54%)	31(70,4%)	13(29,6%)
Группа сравнения (n-80)	41(51,25%)	32(40%)	7(8,75%)	114(71,3%)	46(28,7%)

Из таблицы 1 видно, что в группе с СО преобладают гетерозиготы GT - 50%, в группе без СО преобладают гомозиготы GG - 64,7%, но статистически достоверной разницы между этими группами не выявлено из-за малого размера выборок – метод Пирсона 1,68, $p=0,43$. Распространенность патологического аллеля T в группе ОПТТ составила 25,6%, что соответствует распространенности в группе сравнения 28,7% - точный критерий Фишера двусторонний $p=0.64$.

Распределение генотипов *NOS3* в группах рассмотрено также по гендерному признаку (таб. 7).

Таблица 8. Гендерное распределение генотипов *NOS3* в исследуемых группах.

Группы	Пол	Генотипы гена NOS3			аллели	
		GG	GT	TT	G	T

Группа сравнения (n-80)	Мужчины (n-42)	22 (52,4%)	16 (38,1%)	4 (9,5%)	60 (71,4%)	24 (28,6%)
	Женщины (n-38)	19 (50%)	16 (42,1%)	3 (7,9%)	54 (71,1%)	22 (28,9%)
Группа ОПТТ (n-39)	Мужчины (n-26)	15 (57,7%)	11 (42,3%)	0	41 (78,8%)	11 (21,2%)
	Женщины (n-13)	6 (46,1%)	5 (38,5%)	2 (15,4%)	17 (65,9%)	9 (34,6%)

Достоверных различий в распределении генотипов *NOS3* у мужчин и женщин в группе сравнения и в группе ОПТТ не выявлено: критерий Пирсона – 0,16, $p=0,92$ и 4,24, $p=0,119$ соответственно. Достоверных различий в распределении генотипов среди мужчин в обеих группах не установлено: критерий Пирсона 2,63, $p=0,26$, среди женщин в двух группах также различий нет: критерий Пирсона 0,61, $p=0,73$. Распространенность аллелей в группе сравнения у мужчин и женщин совпадают, в группе ОПТТ у женщин частота аллеля Т выше – 34,6% против 21,2% у мужчин, но статистически это различие не достоверно, точный критерий Фишера 2-сторонний $p=0,27$.

По материалам исследования полиморфизм G849T *NOS3* можно рассматривать, как фактор, влияющий на развитие септических осложнений при остром панкреатите тяжелого течения. При исследовании установлено увеличение частоты встречаемости признанного аллеля риска Т группе с СО. Для получения статистически значимых результатов требуется большее число наблюдений.

ВЫВОДЫ

1. Снижение тяжести состояния и благоприятный исход острого панкреатита тяжелого течения сопровождается повышением уровня васкулярного фактора роста в сыворотке крови. Этот показатель повреждения эндотелия применим для мониторинга состояния больных острым панкреатитом тяжелого течения и оценки эффективности лечебных мероприятий.

2. При остром панкреатите тяжелого течения уровень васкулярного эндотелиального фактора роста сыворотки крови и количество десквамированных эндотелиоцитов значительно выше, чем у здоровых людей. При однократном исследовании эти показатели повреждения эндотелия не применимы для прогноза прогрессирования некроза железы и развития септических осложнений.

3. Способом прогноза исхода сепсиса при остром панкреатите тяжелого течения служит динамическое исследование уровня васкулярного эндотелиального фактора роста. Снижение концентрации этого фактора свидетельствует об утяжелении сепсиса и развитии полиорганной недостаточности при остром панкреатите тяжелого течения.

4. О снижении тяжести состояния и эффективности лечебных мероприятий при остром панкреатите тяжелого течения можно судить по снижению количества десквамированных эндотелиоцитов в период первых 2-х недель от начала заболевания.

5. Ограничение очагов некроза при остром панкреатите тяжелого течения сопровождается повышением концентрации васкулярного эндотелиального фактора роста в сыворотке крови.

6. В группе острого панкреатита тяжелого течения с септическими осложнениями повышена частота патологического аллеля T гена эндотелиальной синтазы оксида азота.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При наблюдении за состоянием пациентов с острым панкреатитом тяжелого течения целесообразно определять уровень васкулярного эндотелиального фактора роста в динамике. При снижении или отсутствии нарастания уровня этого фактора в сыворотке крови следует думать об усилении интоксикации, развитии септических осложнений и корректировать проводимую терапию.

2. Признаком прогрессирования некроза и развития септических осложнений при остром панкреатите тяжелого течения следует рассматривать отсутствие снижения количества десквамированных эндотелиоцитов в период первых 2 недель от начала заболевания. В условиях районного стационара это доступный способ для оценки тяжести состояния и эффективности проводимого лечения при остром панкреатите тяжелого течения. Он позволит своевременно и обоснованно поставить вопрос о переводе больного в специализированное лечебное учреждение.

3. У больных острым панкреатитом тяжелого течения с септическими осложнениями снижение концентрации васкулярного эндотелиального фактора роста свидетельствует за прогрессирование системной воспалительной реакции и развитие полиорганной недостаточности, и служит неблагоприятным прогностическим фактором, указывая на необходимость пересмотра тактики проводимого лечения.

4. Исследование позволило обосновать выбор хирургической или консервативной тактики на этапах лечения больных острым панкреатитом тяжелого течения. Снижение концентрации васкулярного эндотелиального фактора роста указывает на расширение зон некроза, нарастание тяжести сепсиса и полиорганной недостаточности, обосновывая необходимость в санационном вмешательстве.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. *Щёктова А.П., Кривцов А.В., Булатова И.А., Загородских Е.Б.* Эндотелиальная дисфункция и полиморфизм гена эндотелиальной синтазы оксида азота при хронических заболеваниях печени // **Современные проблемы науки и образования** (электронный журнал). – 2012. – №2. URL: www.sciens-education.ru/102-6047.

2. Новые возможности прогнозирования осложнений острого панкреатита и оценки эффективности лечения / *В.А. Черкасов, А.П. Щёктова, С.Э. Латышева, Е.Б. Загородских* // **Пермский медицинский журнал**. – 2013. – том XXX. - №2. – С.10-15.

3. Маркеры эндотелиальной дисфункции и их прогностическое значение при остром панкреатите тяжелого течения/ *Е.Б. Загородских, В.А. Черкасов, А.П. Щёктова* // **Фундаментальные исследования.** – 2013. - № 9. – С. 355-361.

4. Пат. 2517523 Российская федерация МПК G10N. Сособ прогнозирования исхода сепсиса / *Загородских Е.Б., Черкасов В.А., Щёктова А.П., Попов А.В., Николенко А.В., Субботин А.В.*; заявитель и патентообладатель Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермская государственная медицинская академия имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU). – № 2012154919/15; заявл. 18.12.12; опубл. 27.05.14, бюл. №15. – 7с.

5. Удостоверение №2611 на рац. предложение. Способ балльной оценки клинических синдромов при абдоминальном сепсисе / *Е.Б. Загородских*; ГБОУ ВПО ПГМА им. ак. Е.А. Вагнера Минздрава России.