**Методические рекомендации к занятию № 4**

**по дисциплине «Клиническая (био)химия»**

**Тема: Клинико-биохимические констеляции при заболеваниях поджелудочной железы**

**Ферменты панкреатического сока**

Сок поджелудочной железы содержит следующие ферменты:

1) *альфа-амилазу (панкреатическую);*

2) *амило-1,6-гликозидазу;*

3) *олиго-1,6-гликозидазу;*

4) *липазы (панкреатические);*

5) *гидролазу эфиров холестерола;*

6) *фосфолипазы;*

7) *трипсин;*

8) *химотрипсин*

9) *карбоксипептидазу;*

10) *эластазу;*

11) *рибонуклеазу;*

12) *дезоксирибонуклеазу* (таблица 1).

Активация многих из них требует присутствия солей жёлчных кислот и энтерокиназы кишечного сока, сам процесс локализуется в 12-пёрстной кишке.

*Таблица 1*

*Состав энзимов панкреатического сока*

|  |  |
| --- | --- |
| Ферменты | Точка приложения |
| **1** | **2** |
| α-амилаза | *Эндогликозидаза*, осуществляющая гидролиз внутренних α-1,4-гликозидных связей в декстринах. |
| Амило-1,6-гликозидаза | *Эндогликозидаза* гидролизует в декстринах внутренние α-1,6-гликозидные связи. |
| Олиго-1,6-гликозидаза | *Экзогликозидаза* расщепляет в декстринах наружные α-1,6-гликозидные связи. |
| ТАГ-липаза | Гидролизует сложноэфирные связи в молекулах нейтральных жиров только в первом и в третьем положениях. |
| МАГ-изомераза | В моноацилглицеролах облегчает внутри-молекулярный перенос остатков высших жирных кислот из β- в α- положение. |
| Гидролаза эфиров  холестерола  (холестеролэстераза) | Гидролизует сложноэфирные связи в эфирах холестерола с образованием свободных жирных кислот и ХС. |
| Фосфолипаза А1 | Атакует сложноэфирные связи фосфолипидов в 1-ом положении. |
| Фосфолипаза А2 | Разрывает сложноэфирные связи во втором положении глицерофосфатидов на свободную жирную кислоту и лизофосфолипид. |
| Фосфолипаза С | Разрушает в фосфолипидах сложноэфирные связи в положении 3 с отщеплением 1,2-диацилглицерола и остатка фосфорной кислоты с нециклическим азотистым основанием. |
| Фосфолипаза D | Отщепляет от глицерофосфатида азотистое основание с образованием фосфатидной кислоты. |
| Трипсин | *Эндопептидаза*, осуществляющая гидролиз внутренних пептидных группировок, в состав которых входят карбоксильные группы лизина и аргинина. |
| Химотрипсин | Э*ндопептидаза,* которая катализирует разрыв внутренних амидных связей, образованных ароматическими аминокислотами (фенилаланином, тирозином, триптофаном). |
| Карбоксипептидазы | *Экзопептидазы,* отщепляющие от полипептидов С-концевые аминокислоты. Принято выделять *карбоксипептидазу А*, гидролизующую пептидные связи, в состав которых входят С-концевые ароматические аминокислоты, и *карбокси-пептидазу В,* участвующую в разрыве того же типа связей, образованных С-концевыми аргинином и лизином. |
| Эластаза | Э*ндопептидаза,* расщепляющая внутренние амидные связи, состоящие из аминокислот с небольшими радикалами (глицин, серин, аланин). |
| Рибонуклеазы | Э*ндонуклеазы* воздействуют на нуклеиновую кислоту (РНК) и гидролизуют её до пуриновых и пиримидиновых олиго- и монорибонуклеотидов. |
| Дезоксирибонуклеазы | Э*ндонуклеазы*, субстратом которых является ДНК,  а конечными продуктами - пуриновые и пиримидиновые олиго- и монодезоксирибо-нуклеотиды. |

*В двенадцатипёрстной кишке* происходит наиболее важная фаза распада *углеводов.* рН среды слабощелочная, и под действием эндо- и экзогликозидаз (панкреатической α-амилазы, амило-1,6-гликозидазы и олиго-1,6-гликозидазы) декстрины распадаются до более мелких частиц (таблица 3).

В содержимом поджелудочной железы находится несколько видов *фосфолипаз:* фосфолипаза А2 вырабатывается в неактивной форме, конверсия которой обеспечивается трипсином и ионами Са2+.

Активный энзим разрывает эфирную связь во втором положении глицерофосфатидов с образованием свободной ЖК и лизофосфолипида. Фосфолипазы А1 и С воздействуют на этот же вид связи, но только первая атакует ФЛ в 1-ом положении с выделением жирной кислоты, чаще насыщенной и 2-моноацилглицерола, а вторая – в 3-ем с получением - 1,2-диацилглицерола и фосфорилированного азотистого основания. Фосфолипаза D гидролизует глицерофосфатид на азотистое основание и фосфатидную кислоту. Итог их действия: свободные ВЖК, глицерол, азотистые основания, фосфаты.

Поджелудочная железа начинает выбрасывать бикарбонаты, нейтрализующие рН среды в 12-типёрстной кишке. В тонком кишечнике *процесс пищеварения регулируется* действием интестинальных гормонов. При попадании содержимого желудка в двенадцатипёрстную кишку в кровь поступает *секретин*, а также повышается уровень *холецистокинина (панкреозимина*), стимулирующего выработку четырёх протеолитических ферментов эндокринными клетками pancreas:

1) *трипсиногена;*

2) *химотрипсиногена;*

3) *проэластазы;*

4) *прокарбоксипептидазы.*

Вышеназванные энзимы синтезируются в виде проферментов, что защищает клетки поджелудочной железы от саморазрушения. Активация зимогенов происходит следующим образом:

Са2+ энтерокиназа

трипсиноген трипсин

аутокатализ

Под влиянием *энтерокиназы* кишечного сока и с участиемкатионов кальция осуществляется частичный протеолиз трипсиногена, в результате он активируется, начальные порции его путём аутокатализа переводят основную массу профермента в трипсин. Последний относится к *эндопептидазам*, катализирует гидролиз внутренних амидных связей*,* образованных НООС-группами основных аминокислот (лизина и аргинина).

Трипсин обеспечивает активацию химотрипсиногена, а затравочные порции химотрипсина (*эндопептидазы*)*,* способствуют преобразованию большой части предшественника в фермент, гидролизующий внутренние пептидные связи с участием ароматических аминокислот (фенилаланина, тирозина, триптофана), является аналогом пепсина.

трипсин

Химотрипсиноген химотрипсин

аутокатализ

Чтобы предотвратить разрушение белков цитолемм протеазами, в тонком кишечнике синтезируется специфическое соединение – *ингибитор панкреатического трипсина*, представляющий собой низкомолекулярный пептид, который может связываться с активными центрами трипсина и химотрипсина, вызывая их обратимое угнетение.

Трипсин выступает также в роли активатора проэластазы и прокарбоксипептидазы:

трипсин

Проэластаза эластаза

Последняя - представитель *эндопептидаз,* расщепляющих в эластине внутренние амидные группировки, включающие аминокислоты с небольшими радикалами (глицин, серин, аланин).

трипсин

Прокарбоксипептидаза карбоксипептидаза

Это *экзопептидаза,* катализирующая гидролиз олигопептида с С-конца. Существуют два вида этих ферментов: карбоксипептидаза А, атакующая амидные связи, образованные С-концевыми ароматическими и гидрофобными аминокислотами, и карбоксипептидаза В с той же точкой приложения, однако, в состав которых входят основные С-концевые мономеры (аргинин и лизин).

Э*ндонуклеазы* панкреатического сока - рибонуклеазы и дезоксирибонуклеазы, воздействуя на нуклеиновые кислоты, гидролизуют их до пуриновых и пиримидиновых олиго- и мононуклеотидов.

*Регуляция панкреатического сокоотделения* осуществляется под контролем как активаторов, в роли каковых выступают серотонин, инсулин, бомбезин, соли жёлчных кислот, так и ингибиторов – глюкагон, соматостатин, энкефалины, АКТГ. Установлено, что вазоактивный интестинальный полипептид может оказывать как стимулирующее, так и тормозящее действие на секрецию поджелудочной железы.

**Повреждения экзокринной активности поджелудочной железы**

***Муковисцидоз.*** Частота его составляет 1 на 2500 новорождённых. Это наследственное заболевание, передающееся по рецессивному признаку, при котором аномальный эпителиальный транспорт хлоридов стимулирует образование густого содержимого, блокирующего секреторные протоки и альвеолы. Муковисцидоз чаще диагностируется в детском возрасте, но встречается также и у взрослых. Панкреатическая недостаточность выявляется приблизительно в 85% случаев, но наиболее частой причиной летального исхода становится лёгочная дисфункция.

***Острый панкреатит.*** Установлен ряд факторов, предрасполагающих к данной патологии, хотя механизмы их действия изучены пока недостаточно. Среди них выделяют: употребление алкоголя (острое и хроническое); наличие камней жёлчного пузыря; травмы (тупые абдоминальные повреждения, постэндоскопическая ретроградная холан- гиопанкреатография, состояние после абдоминальной хирургии); метаболические нарушения (тяжёлая гипертриацилглицеролемия, гиперкальциемия, почечная недостаточность); инфекционные заболевания; действие лекарственных препаратов.

Вышеуказанные причины активируют некоторые панкреатические зимогены внутри клеток самой железы, вызывая отёк, протеолиз, некроз, сосудистые повреждения и кровоизлияния в pancreas и в окружающие ткани – в брюшную полость. Раздражение нервных окончаний провоцирует абдоминальные боли, которые служат основным клиническим симптомом этого заболевания.

***Хронический панкреатит.*** Хронический алкоголизм и другие вышеперечисленные моменты имеют немаловажное значение в возникновении этого страдания. С другой стороны, в менее развитых странах недостаток питания выступает на первый план. Основу патогенеза недуга составляет воспаление с последующим фиброзом поджелудочной железы, что сопровождается экзокринной недостаточностью. В клинике одни больные жалуются на постоянные боли в животе; у других – доминируют признаки мальабсорбции; у третьих – при лабораторном исследовании регистрируется толерантность к глюкозе.

***Карцинома поджелудочной железы.*** У пациентов возникают абдоминальные боли, развивается кахексия, возможна механическая желтуха.

Последняя обусловлена сдавлением желчевыводящих протоков увеличенными размерами pancreas. Разрастание ткани органа сопровождает блокаду её протоков, обусловливая экзокринную недостаточность, что является существенным фактором потери массы тела.

**Оценка панкреатической функции**

Исследование деятельности поджелудочной железы включает биохимические и динамические функциональные тесты. Последние делятся на *прямые*, когда тонкий кишечник интубируется и проводится сбор панкреатического содержимого (проба на стимуляцию секретином/ХЦК-панкреозимином и тест Лундха), или *непрямые*, когдаоценка секрета идёт без интубации (ПАБК и флюоресцин-дилауратный тесты).

Определение активности ферментов в жидкостях организма. ***Амилаза сыворотки.*** В диагностике хронического панкреатита данное исследование имеет несущественное клиническое значение,так как источником этого энзима являются не только pancreas, но и слюнные железы.

При остром панкреатите отмечаются высокие цифры активности фермента в сыворотке. Уровни, превышающие более чем в 10 раз верхний предел нормальных значений, являются достаточно точными диагностическими критериями данного заболевания; более чем 5-кратное превышение верхней границы физиологических значений служит недостоверным признаком страдания. Установлено, что максимальная активность энзима наблюдается в течение 24-48 часов после приступа; но в пределах 72 часов показатель возвращается к норме. Этот белок имеет небольшую молекулярную массу (45 000 Да), поэтому легко удаляется из сосудистого русла почками, а при остром панкреатите клиренс его увеличивается.

***Другие панкреатические ферменты.*** При остром панкреатите активность *липазы* в плазме остаётся повышенной в течение более продолжительного времени, чем вышеназванный параметр, хотя считается, что скорость гидролиза липидов - менее чувствительный индикатор панкреатического повреждения.

Уровень *иммунореактивного трипсина* (активность трипсина в сыворотке ингибируется антипротеазами) снижается при недостаточности поджелудочной железы, но часто растёт при муковисцидозе в результате утечки этого фермента из блокированных панкреатических протоков.

***Тест стимуляции секретином/холецистокинином-панкреозимином.*** Натощак проводится зондирование пациента двухканальным зондом так, чтобы содержимое желудка и тонкого кишечника забирались отдельно. Это расценивают как секрецию в состоянии покоя. Затем внутривенно вводится секретин и спустя 30 минут – холецистокинин. Данная процедура используется для выяснения эффектов каждого гормона: изучаются как объёмы секреции, так и концентрация бикарбонатов и активность ферментов. При хроническом панкреатите с сохранной секрецией цифры первых и активность вторых падают. Низкие объёмы отделяемого регистрируются у пациентов с карциномой головки поджелудочной железы.

***Тест Лундха.*** Проводится простейшая процедура зондирования, при которой одноканальный зонд вводится в двенадцатипёрстную кишку и отбирается сок в состоянии покоя. Затем употребляется пища, включающая 40 г декстрозы, 15 г молочного белка и 18 г растительного масла, и через 2 часа отсасывается содержимое 12-пёрстной кишки. Сниженная трипсиновая активность свидетельствует о панкреатической экзокринной недостаточности.

***Всасывание ПАБК.*** Этот тест предполагает пероральное введение синтетического пептида – БТ-ПАБК (N-бензоил-L-тирозил-парааминобензойной кислоты) в дозе 0,5 г, который расщепляется химотрипсином до ПАБК. Последняя, всасавшись в тонком кишечнике, поступает в печень, где связывается с глицином и экскретируется почками с мочой. Установлено, что если величины парааминобензойной кислоты, конъюгированной в гепатоцитах и выделенной с мочой, соответствуют долям введённой радиоактивной ПАБК, то данный параметр характеризует панкреатическую функцию. Пациент получает БТ-ПАБК с пищей для одновременной стимуляции секреции поджелудочной железы. Сбор мочи с целью определения концентрации ПАБК производят в течение 6 часов. При хроническом панкреатите уровень данного метаболита падает. Тоже самое отмечается при патологии тонкого кишечника и печени, хотя в данной ситуации оказывают влияние другие факторы, не связанные с перевариванием пептида. В этом случае в тест-систему вводят [14С] – ПАБК, не подвергающийся гидролизу.

***Флюоресцин-дилауратный (панкреолаурильный) тест.*** Флюоресцина дилаурат представляет собой синтетический субстрат, подвергающийся расщеплению панкреатической холестеролэстеразой. Высвобождаемый при этом флюоресцин в тонком кишечнике всасывается, в печени биотрансформируется путём конъюгации и удаляется с мочой, где он также может быть измерен. При повреждении pancreas цифры его в моче снижены из-за нарушения ферментативной функции железы.

Количественное определение активности амилазы мочи

Амилаза крови частично выделяется с мочой. Изменение содержание этого фермента в моче чаще всего встречается при заболевании поджелудочной железы, особенно при острых панкреатитах.

Амилазную активность выражают в миллилитрах 0,1%-го раствора крахмала, гидролизуемого одним мил­лилитром неразведенной мочи при 45° С в течение 15 мин. В моче здорового человека активность амилазы составляет 16—64 мл (единиц).

Ход работы

Берут 6 пронумерованных пробирок и приливают в каждую по 1 мл физиологического раствора. Далее в первую пробирку приливают 1 мл исследуемой мочи, перемешивают содержимое и 1 мл смеси переносят во вторую пробирку, перемешивают содержимое и 1 мл смеси переносят в третью пробирку и т, д. Из шестой пробирки 1мл смеси выливают. Таким образом получают следующие разведения мочи: 1/2; 1/4; 1/8; 1/16 и т.д. Затем в каждую пробирку наливают по 2 мл. крахмала, взбалтывают и все пробирки помещают в термостат при 45°С на 15 минутЧерез 15 мин пробирки вынимают из термостата, охлаждают холодной водой и ставят в штатив по порядку. Добавляют в каждую пробирку по 1 капле йода в йодистом калии. В пробирке, где жидкость окрашивается в синий цвет, расщепление не произошло. Для расчета принимают во внимание последнее разведение, в котором после добавления крахмала не появился синий цвет по формуле 7. Например, это третья пробирка, а в четвертой уже синее окрашивание, тогда разведение мочи соответствует 1/8. Расчет: 1/8 мл мочи расщепляет 2 мл0,1% -го крахмала:



Следовательно, 1 мл нёразведенной мочи расщепляет за 15 мин 16 мл 0,1%-го раствора крахмала

Качественное обнаружение амилазы в вытяжке поджелудочной железы

α-Амилаза — фермент, содержащийся в секретах слюнных, поджелудочной желез и слизистой тонкого кишечника.

По характеру действия этот фермент является гидролазой, расщепляющей 1,4-глюкозидную связь крахмала с образованием мальтозы или глюкозы. Промежуточными продуктами могут быть различные декстрины. Степень гидролиза крахмала можно контролировать, используя реакцию с йодом. Крахмал дает с йодом синее окрашивание, декстрины в зависимости от размеров молекул окрашиваются йодом в разные цвета (фиолетовый, красно-бурый). Второй контрольной пробой может быть реакция Троммера, указывающая на наличие свободных альдегидных групп (в мальтозе или глюкозе).

Ход работы.

В большую пробирку помещают 2 мл 0,1 % -го раствора крахмала и добавляют 1 мл вытяжки поджелудочной железы. Пробирку оставляют стоять при комнатной температуре, отбирая пипеткой в отдельные пробирки каждые 2 мин 8 капель гидролизата и добавляя в них по одной капле йода. Обратить внимание на изменение окраски гидролизата с йодом в ходе гидролиза. Отбор проб производить до прекращения изменения окраски. К последней пробе в большой пробирке добавить 6—8 капель 10% -го раствора гидроксида натрия, а затем добавлять по каплям 2% -й раствор сульфата меди, пока не прекратит­ся его растворение. Полученный раствор осторожно нагреть на спиртовке. Появление желто-красного окрашивания говорит о положительной реакции Троммера.

Количественное определение активности амилазы в сыворотке крови **(по Вольгемуту)** при панкреатитах

Ход работы

1 мл сыворотки крови разводят дистиллированной водой в 10 раз. В 10 пронумерованных пробирок наливают из бюретки по 1 мл воды. В первую пробирку пипеткой отмеривают 1 мл разбавленной в 10 раз сыворотки крови, перемешивают содержимое путем втягивания и вы­пускания жидкости с помощью пипетки.

* 1. мл полученного разведения переносят во вторую пробирку, перемешивают указанным способом и 1 мл из второй пробирки переносят в третью и т. д. Таким образом, получают 10 разведений слюны, причем концентрация амилазы в каждой пробирке в 2 раза меньше, чем в предыдущей. Из 10-й пробирки 1 мл жидкости отбрасывают. Затем, начиная с 10-й пробирки, из бюретки добав­ляют по 2 мл 0,1% -го раствора крахмала и по 1 мл воды, тщательно перемешивают и помещают в термостат при 37°С на 30 мин.

Через 30 мин пробирки вынимают, охлаждают под краном с водой, расставляют по порядку в штативе, прибавляют в каждую пробирку по 1 капле раствора йода в йодистом калии и перемешивают. Отмечают получившуюся в пробирках окраску. Синий цвет указывает на присут­ствие нерасщепленного крахмала, красно-бурый — на промежуточные продукты расщепления — декстрины, желтый — на наличие декстринов, не дающих окраски с йодом, и мальтозы.

Для вычислений амилазной активности в ряду пробирок отбирают ту, в которой произошло полное расщепление крахмала при максимальном разведении сыворотки. Зная разведение сыворотки и количество добавленного крахмала, вычисляют по формуле 8, сколько крахмала мог бы расщепить 1 мл неразведенной сыворотки крови.

Пример расчета Допустим, что в пятой пробирке произошло полное расщепление крахмала, в которой разведение сыворотки соответствует 1: 320. 1/320 мл сыворотки расщепляет 2 мл 0,1 % -го раствора крахмала, 1 мл неразведенной сыворотки расщепит X мл 0,1% -го раствора крахмала, следовательно, активность амилазы сыворотки равна:

image14

Клинико-диагностическое значение определения активности амилазы в биологических жидкостях (в сыворотке крови):

Повышение— острый панкреатит, обострение хронического панкреатита, перфорация язвы двенадцатиперстной кишки, рак поджелудочной железы, болезни слюнных желез, паротит, камни в слюнных железах.

Снижение — некроз поджелудочной железы, тиреотоксикоз, болезни печени и почек.

**Лабораторная диагностика хронического панкреатита**

**Хронический панкреатит** – это медленно прогрессирующее воспалительное заболевание поджелудочной железы, которое характеризуется фокальными некрозами в сочетании с фиброзом, и приводящее к прогрессирующему снижению экзо- и эндокринной функции органа (даже после прекращения воздействия этиологического фактора). Условно о хроническом панкреатите говорят, когда воспалительный процесс в поджелудочной железе продолжается более 6 месяцев.

Диагностика хронического панкреатита основана на данных объективного клинического, инструментального (УЗИ, компьютерная томография, магнитно-резонансная томография, ЭРХПГ) и лабораторного исследования. Рассмотрим подробнее лабораторную диагностику хронического панкреатита.

**1**. **Клинический анализ крови** (при обострении хронического панкреатита может встречаться лейкоцитоз, ускорение СОЭ. при развитии белково–энергетической недостаточности – анемия).

**2**. **Исследование содержания (активности) ферментов поджелудочной железы**:   
• амилаза в крови и моче: в периоде ремиссии хронического панкреатита может быть в норме, при обострении умеренно повышается (на 30%) при повышении сывороточной амилазы более 4 норм следует думать об остром панкреатите; амилаза мочи – менее чувствительный маркер острого панкреатита, чем амилаза крови;

• эластаза-1 в крови и кале (см. п.4) – высокочувствительный маркер; активность этого фермента в крови повышается при панкреатите раньше, чем уровень других ферментов, и удерживается дольше.

**(!)** Иммуноферментный метод определения эластазы-1 в кале на сегодняшний день является «золотым стандартом» – самым информативным из неинвазивных методов диагностики экзокринной недостаточности поджелудочной железы (см. п.4). Этот фермент абсолютно специфичен для поджелудочной железы, не разрушается при прохождении через ЖКТ и, что немаловажно, на результаты теста не влияет заместительная фарментная терапия. Экзокринная недостаточность диагностируется при снижении эластазы 1 ниже 200 мкг/г кала.

**3**. **Другие ферменты поджелудочной железы**. Высокочувствительными и специфичными тестами, свидетельствующими об обострении заболевания, являются повышение активности сывороточной липазы, а также сывороточного трипсина и уменьшение концентрации ингибитора трипсина. Однако при выраженном фиброзе поджелудочной железы уровень ферментов в сыворотке крови даже при обострении заболевания может быть нормальным или низким.

**4**. **Оценка внешнесекреторной функции поджелудочной железы**: осуществляется с помощью зондовых (инвазивных, требующих введения кишечного зонда) и беззондовых методов. Зондовые методы (тесты) информативные, но трудоемкие, дорогостоящие и могут иметь осложнения и в настоящее время применяются редко. Преимущество беззондовых методов заключается в безопасности для пациента и относительно низкой стоимости, однако практически все они имеют низкую чувствительность и специфичность по сравнению с инвазивными методиками. ! Проведение зондовых и беззондовых методов не считается необходимым для каждого пациента с патологией ЖКТ.

(1) **стандартное копрологическое исследование**: критериями внешнесекреторной недостаточности являются повышенное содержание в кале нейтрального жира и мыл при малоизмененном содержании жирных кислот; повышенное количество мышечных волокон в кале (креаторея) – является более поздним, чем стеаторея, признаком недостаточности поджелудочной железы и свидетельствует о более тяжелой степени нарушений;

(2) **количественное определение жира в кале** – трудоемкий, но достаточно информативный тест (нормальное количество жира в кале менее 5 г/сут):   
• зондовые методы – (1) секретин–панкреозиминовый (секретин–холецистокининовый) тест снован на оценке прироста секреции на фоне введения секретина и холецистокинина; чувствительность и специфичность метода составляет более 90%, однако с его помощью невозможно провести дифференциальную диагностику с другими заболеваниями поджелудочной железы, поскольку при раке, муковисцидозе и других заболеваниях поджелудочной железы в 75–90% регистрируются патологические результаты; (2) непрямой зондовый метод (тест Лунда) основан на сборе тонкокишечного содержимого с помощью интубации после приема стандартного пробного завтрака; в зависимости от степени внешнесекреторной недостаточности поджелудочной железы чувствительность теста колеблется от 66 до 94%; большинство авторов сообщают о низкой чувствительности данного теста на ранних стадиях внешнесекреторной недостаточности; ложноположительные результаты могут фиксироваться у больных с целиакией, гастриномой, сахарным диабетом.;   
• беззондовые методы диагностики проще, дешевле и несут минимальный риск осложнений, однако обладают меньшей чувствительностью и специфичностью, чем зондовые методы; все они основаны на пероральном введении специфических субстратов для ферментов поджелудочной железы; после взаимодействия последних с ферментами поджелудочной железы в моче и/или в сыворотке крови определяются продукты расщепления, по количеству которых судят о степени внешнесекреторной недостаточности: 1 - бентирамидный тест\* (NBT–PABA тест); 2 - йодо-липоловый тест: липаза расщепляет йодолипол до йодидов, которые определяются в моче; 3 - флюоресцеин–дилауратный тест.

\*Бентирамидный тест (NBT-PABA-тест). Основан на том, что N-бензоил-L-тирозил-р-аминобензойная кислота (NBT - специфичный для химотрипсина трипептид) гидролизуется химотрипсином до р-аминобензойной кислоты (PABA); затем PABA всасывается, конъюгируется в печени и экскретируется с мочой, где ее и определяют. Уровень PABA в моче отражает количество экскретируемого поджелудочной железой химотрипсина. Чувствительность теста составляет 83%, специфичность 89%. Ложноположительные результаты отмечаются примерно у 1/4 больных с заболеваниями тонкой кишки.

Также к беззондовым методам исследования внешнесекреторной недостаточности поджелудочной железы у больных с хроническим панкреатитом относят:  
• определение степени потребления плазменных аминокислот поджелудочной железой: метод основан на том, что при стимуляции секретином или церулеином поджелудочная железа поглощает из плазмы крови большое количество аминокислот, необходимых для синтеза панкреатических ферментов; чувствительность метода составляет 69–96%, специфичность – 54–100%;

• качественное копрологическое исследование: общими критериями внешнесекреторной недостаточности считаются повышенное содержание нейтрального жира и мыл при малоизмененном уровне желчных кислот, увеличение содержания непереваренных мышечных волокон, а также присутствие в кале крупных фрагментов непереваренной пищи;  
• количественное определение жира в кале: метод основан на том, что после приема 100 г жира с пищей происходит выделение с калом до 7 г нейтрального жира и жирных кислот за сутки; увеличение его количества свидетельствует о расстройствах переваривания и всасывания жира;

• определение фекального трипсина и химотрипсина: тест основан на измерении уровня трипсина и химотрипсина в образцах кала (предпочтительно из суточного количества); чувствительность теста составляет 70–90%, специфичность – 50–80%; при определении содержания химотрипсина в кале получают около 10% ложноотрицательных и 13% ложноположительных результатов.

В настоящее время наиболее информативным способом оценки внешнесекреторной функции поджелудочной железы служит определение активности панкреатической эластазы-1 (Е1) - фермента поджелудочной железы, который остается в неизмененном виде во время его транзита по кишечнику. Концентрация этого фермента в стуле отражает истинное состояние экзокринной функции поджелудочной железы. Концентрация Е1 в дуоденальном соке – 4-6% от общего белка. Е1 стабильна при хранении образцов кала: при +4-80С до 3-х дней; при -200С – до 1 года. В отличие от других методов диагностики внешнесекреторной функции определение Е1 в кале имеет следующие преимущества:

• Е1 является абсолютно специфичной для поджелудочной железы;  
• Е1 – самый стабильный фермент при транзите по кишечнику и его количество в кале в 5-6 раз выше, чем в дуоденальном соке и концентрация Е1 отражает секреторную способность поджелудочной железы. Таким образом, с помощью теста на Е1 можно определить или исключить наличие экзокринной недостаточности поджелудочной железы;

• результаты определения коррелируют с результатами инвазивных тестов;  
• различия в концентрации Е1 кала, полученных от разных индивидуумов очень незначительны;

• заместительная ферментативная терапия не влияет на концентрацию Е1 (моноклональные антитела, используемые в данном тесте, не взаимодействуют с эластазой животного происхождения, которая присутствует в ферментативных препаратах).

**5**. **Оценка инкреторной функции поджелудочной железы**: расстройства углеводного обмена при хроническом панкреатите выявляются примерно у 1/3 больных; всем пациентам с хроническим панкреатитом рекомендуется проводить глюкозотолерантный тест для выявления нарушенной толерантности к глюкозе и сахарного диабета.

Контрольные вопросы к разделу:

1. В чем заключается: а) эндокринная функция поджелудочной железы? б) экзокринная функция поджелудочной железы?
2. Каковы химическая природа и биологическая роль соматостатина панкреатического?
3. Каковы химическая природа и биологическая роль вазоактивного интестинального полипептида (ВИП)?
4. Каковы химическая природа и биологическая роль панкреатического полипептида (ПП)? Принцип метода определения амилазной активности биологических жидкостей.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:**

1. Биохимические основы патологических процессов / Под ред. Е.С.Северина. – М.: «Медицина», 2000. – 304 с.

2. Биохимия / Под ред. Е.С.Северина – М.: Издательский дом «ГЭОТАР-МЕД», 2003. – 782с.

3. Биохимия человека в 2-х томах / Р.Марри, Д.Греннер, П.Мейес, В.Родуэлл (Пер. с англ). – М.: «Мир», 1993. - Т.1. – 428с. – Т.2. – 415с.