

СИНДРОМ СИСТЕМНОЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ И ВОЗМОЖНЫЙ ПУТЬ КОРРЕКЦИИ ПРИ ОСТРОМ ПАНКРЕАТИТЕ

В. Горский, доктор медицинских наук, профессор,
М. Агапов, доктор медицинских наук,
М. Хорева, кандидат медицинских наук
 РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва
E-mail: getinfo911@mail.ru

Одной из актуальных проблем современной ургентной хирургии остается высокая смертность при остром панкреатите (ОП). Летальный исход в 1-м периоде заболевания объясняется развитием синдрома системной воспалительной реакции и полиорганной недостаточностью вследствие выброса в периферический кровоток медиаторов воспаления – цитокинов. Изучены возможности фармакологической коррекции осложнений 1-го периода ОП.

Ключевые слова: острый панкреатит, синдром системной воспалительной реакции, цитокины, лорноксикам.

Острый панкреатит (ОП) представляет собой деструктивный процесс ткани поджелудочной железы разной степени выраженности. Рассматривая ОП как эволюционирующий во времени процесс, в ходе которого наблюдается закономерная смена периодов и фаз заболевания, можно выделить ряд осложнений, типичных для фазы как панкреатогенной токсемии, так и деструктивных осложнений. Эти осложнения и определяют особенности течения заболевания в каждом конкретном случае, диктуя выбор определенной диагностической и лечебной тактики. Синдром системной воспалительной реакции (ССВР) может развиваться в любую фазу течения панкреатита и быть основным синдромом, при этом его патогенетическую основу определяют совершенно разные механизмы. Мы остановимся на периоде панкреатогенной токсемии, его патогенетических аспектах и путях коррекции возможных осложнений.

В 1992 г. под эгидой Общества реаниматологов США состоялась согласительная конференция по сепсису [6], на которой были подтверждены критерии его диагностики и предложен новый синдром, получивший название ССВР.

Таким образом, сепсис перестал рассматриваться как процесс, вызываемый одними только микробными факторами патогенности. В общих чертах ССВР – абсолютная нормальная реакция на инвазию. Однако вследствие сверхактивности происходящих процессов ССВР может поставить под угрозу функционирование различных органов и систем, что приводит к синдрому полиорганной недостаточности.

В патогенезе ОП мы находим яркое подтверждение так называемой гипотезы двойного удара [4, 10]. Пациенты с проявлениями ССВР в начальной фазе воспалительного повреждения могут умереть после относительно незначительной «второй волны», которая в нормальных условиях

не была бы опасна для жизни, т.е. во время появления начального сверхактивного ССВР происходит сенсibilизация иммунной системы. Затем при отсутствии какого-либо дальнейшего повреждения может наступить выздоровление, что и происходит при абортном течении ОП. Но если присоединяется бактериальная инфекция, то, несмотря на невыраженность бактериальной агрессии, 2-й приступ может привести к эскалации вторичной воспалительной реакции. Таким образом, инфекционные осложнения при ОП могут проявиться непосредственно как сверхсильный ССВР с последующей полиорганной недостаточностью и смертью.

Сегодня известно, что ведущую роль в патогенезе ОП играют медиаторы воспаления: провоспалительные цитокины, такие как интерлейкины (ИЛ) 1, 6, 8 и фактор некроза опухоли- α (ФНО α), а также циклооксигеназа (ЦОГ) и другие медиаторы [11]. Результатом их влияния являются увеличение сосудистой проницаемости, миграция лейкоцитов, локальное повреждение тканей, генерализация воспалительной реакции, повреждение органов естественной детоксикации с развитием полиорганной недостаточности [5].

Цитокины – семейство низкомолекулярных белков (масса – 16–25 kDa), которые секретируются множеством клеток, включая макрофаги и моноциты. Секреция цитокина – очень четко отрегулированный процесс, и экспрессия большинства цитокинов модулируется факторами транскрипции, такими, как ядерный фактор (NF)- κ B. Причиной выброса цитокинов является активация мононуклеарных клеток (МНК) посредством Toll-подобных рецепторов (TLR). Считается, что TLR играют ключевую роль в патогенной идентификации и врожденном иммунитете [9, 12].

Эффекты всех цитокинов осуществляются через определенные поверхностные рецепторы клеток. Большинство цитокинов имеют плейотропную активность и проявляют многократные функциональные эффекты в отношении множества клеток-мишеней. И если цитокины вызывают «полезную» воспалительную реакцию, чтобы ограничить повреждение ткани, то чрезмерная продукция этих провоспалительных агентов может быть еще более опасной, чем первичный стимул [14].

Термин «цитокиновый шторм» не имеет точного определения и относится к частному виду бесконтрольной иммунной реакции. «Цитокиновый шторм» при ОП – потенциально фатальная иммунная реакция, основывающаяся на положительной обратной связи между цитокинами и иммунными клетками. Когда иммунная система борется против инфекционных агентов, цитокины сигнализируют иммунным клеткам (таким как Т-лимфоциты и макрофаги), чтобы они направились в участок инфекции. В дополнение цитокины активизируют клетки, стимулируя их к еще большему производству цитокинов. Эта положительная обратная связь становится бесконтрольной, когда слишком много иммунных клеток активизируется в одном месте. «Цитокиновый шторм» создает потенциал для значительного повреждения тканей и органов. Таков механизм, посредством которого выброс большого количества цитокинов способствует прогрессированию тяжело-го ССВР при ОП.

Нами изучено влияние ингибитора ЦОГ лорноксикама на выработку про- и противовоспалительных цитокинов, опосредованную лигандами TLR 1-го и 2-го типов (TLR1/2) и TLR 4-го типа (TLR4) МНК периферической крови у здоровых доноров *in vitro* и у больных ОП.

Исследование проведено на кафедрах иммунологии и экспериментальной и клинической хирургии медико-биологического факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

В группе здоровых доноров периферической крови было 10 человек в возрасте от 20 до 40 лет, в группе больных ОП токсической этиологии – 11 пациентов, которым проводили консервативную терапию ОП, согласующуюся с приказом №181 ДЗ Москвы. У 6 из этих пациентов (основная группа) комплексную терапию дополняли нестероидным противовоспалительным препаратом группы оксикамов – лорноксикамом. Препарат вводили внутривенно при среднетяжелом течении ОП и в круглую связку печени (лимфотропно) – при тяжелом его течении. Остальные 5 больных (группа сравнения) получали только стандартную базисную терапию.

МНК выделяли из гепаринизированной периферической крови (25 ЕД на 1 мл крови) здоровых доноров и пациентов с деструктивным ОП в одноступенчатом градиенте плотности фиколл-урографина (Pharmacia, $\rho=1,077$ г/см³). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 (НПП «ПанЭко»), содержащей 5% сыворотки эмбрионов коров (HyClone, Perbio), 2 мМ L-глутамин (НПП «ПанЭко») и 100 мкг/мл гентамицина (ОАО «Дальхимфарм», Хабаровск) в течение 24 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Рабочая концентрация клеток составляла $1 \cdot 10^6$ в 1 мл.

В качестве лигандов TLR использовали следующие стимуляторы: пептидогликан (ПГ) (*Staphylococcus aureus*, Sigma/Fluka) – 2,5 мкг/мл и липополисахариды (ЛПС) (*E. coli* 0127: B8, Sigma) в дозе 0,1 мкг/мл, действующие соответственно через TLR1/2 и TLR4. Контролем служили МНК, культивируемые только в полной среде RPMI-1640. По окончании культивирования (24 ч) МНК осаждали центрифугированием при 400 об. в течение 15 мин, получали супернатанты и хранили их в течение 2–3 мес при температуре -70°C.

Выработку цитокинов МНК периферической крови здоровых доноров *in vitro* стимулировали лигандами TLR1/2 (ПГ) и TLR4 (ЛПС) в присутствии лорноксикама в концентрациях 10, 100 и 150 мкг/мл. По окончании культивирования (24 ч) МНК осаждали центрифугированием при 400 об. в течение 15 мин, получали супернатанты и хранили их в течение 2–3 мес при температуре -70°C. Концентрацию цитокинов ИЛ1 β , 6, 8, 10 и 12, а также ФНО α определяли в супернатантах культур клеток с использованием иммуноферментного анализа, применяя коммерческие тест-системы Biosource.

При статистической обработке материала использована программа Statistica. Результаты выражали как среднее арифметическое для анализируемой группы показателей (М) \pm стандартное отклонение (σ) либо в виде медианы (Ме) и процентилей (25–75%). Для

оценки достоверности различий применяли непараметрические критерии Уилкоксона и Манна–Уитни. Различия средних показателей считали достоверным при уровне значимости $<0,05$.

На 1-м этапе мы исследовали влияние ингибитора ЦОГ – лорноксикама на выработку провоспалительных (ИЛ1 β , 6, 8, 12, ФНО α) и противовоспалительного (ИЛ10) цитокинов МНК периферической крови здоровых доноров, опосредованную TLR1/2 и TLR4.

Выявили, что лорноксикам достоверно ингибирует выработку ФНО α , ИЛ1 и ИЛ6 МНК в ответ на ПГ, лиганд TLR1/2. Максимальная ингибиция продукции этих цитокинов наблюдались при дозе лорноксикама 150 мкг/мл (табл. 1).

Выработка ФНО α МНК периферической крови здоровых доноров при стимуляции ПГ составила 1050 ± 581 пг/мл, при добавлении лорноксикама и в концентрации 150 мкг/мл индуцированная выработка ФНО α достоверно снижается до 212 ± 136 пг/мл. Достоверное снижение стимулированной ПГ выработки ИЛ1 происходит при добавлении лорноксикама в концентрации 100 мкг/мл (с 2012 ± 533 до 670 ± 185 пг/мл), а применение его в концентрации 150 мкг/мл способствует дальнейшему подавлению выработки ИЛ1 до 201 ± 96 пг/мл.

Индуцированная секреция ИЛ6, как и описанных выше цитокинов, подавляется лорноксикамом только при стимуляции ПГ, однако степень ее подавления лорноксикамом для ИЛ6 существенно ниже, чем для ФНО α и ИЛ1: снижение в среднем составило $50,2 \pm 26,1\%$ (с 1624 ± 615 до 786 ± 90 пг/мл). Мы не выявили достоверного подавления ЛПС-опосредованной продукции цитокинов ФНО α , ИЛ1 и ИЛ6 даже при использовании максимальной концентрации препарата.

Лорноксикам достоверно ингибирует выработку хемокина ИЛ8 и ИЛ12 в ответ на стимуляцию как ЛПС, так и ПГ, причем максимальный ингибирующий эффект наблюдается в дозе 150 мкг/мл.

Таблица 1
Подавление лорноксикамом выработки про- и противовоспалительных цитокинов *in vitro* (М $\pm\sigma$)

Цитокины	Лиганд	Стимулированная выработка, пг/мл	Ингибирование, % при действии лорноксикама		
			10 мкг/мл	100 мкг/мл	150 мкг/мл
ФНО α	ЛПС	612 \pm 262	Не влияет	12,85 \pm 8,72	33,43 \pm 29,77
	ПГ	1050 \pm 581	Не влияет	29,71 \pm 13,27	70,86 \pm 19,96*
ИЛ1	ЛПС	568 \pm 305	14,84 \pm 9,50	Не влияет	42,69 \pm 27,30
	ПГ	2012 \pm 533	18,48 \pm 14,19	65,70 \pm 20,37*	85,71 \pm 5,19*
ИЛ6	ЛПС	1736 \pm 443	9,35 \pm 6,09	4,76 \pm 3,64	29,47 \pm 7,29
	ПГ	1624 \pm 615	13,09 \pm 7,09	15,05 \pm 4,18	50,22 \pm 26,11*
ИЛ8	ЛПС	11153 \pm 4050	7,41 \pm 5,67	36,50 \pm 31,44	60,63 \pm 22,51*
	ПГ	9958 \pm 4316	10,93 \pm 6,55	43,16 \pm 28,53	70,63 \pm 12,67*
ИЛ10	ЛПС	84 \pm 61	Не влияет	50,45 \pm 30,93	80,82 \pm 18,37*
	ПГ	36 \pm 23	13,97 \pm 8,24	18,25 \pm 14,34	86,92 \pm 8,88*
ИЛ12	ЛПС	474 \pm 120	11,68 \pm 9,99	78,12 \pm 18,23*	85,11 \pm 11,08*
	ПГ	362 \pm 125	4,53 \pm 3,47	58,83 \pm 40,17	91,22 \pm 5,00*

Примечание. * – достоверность различий с уровнем значимости $\alpha=0,05$.

Активация TLR приводит к выработке не только про-, но и противовоспалительных цитокинов, в частности ИЛ10. Исследование влияния лорноксикама на выработку ИЛ10 показало, что в дозе 150 мкг/мл препарат достоверно ингибирует как ЛПС-, так и ПГ-опосредованную выработку ИЛ10.

На следующем этапе мы оценивали опосредованную лигандами TLR выработку цитокинов МНК больных деструктивным ОП в сравниваемых группах. Стимулирующее влияние лигандов на функциональную активность МНК оценивали по продукции ФНО α . Спонтанную выработку ФНО α принимали за 1, для оценки действия лигандов TLR на продукцию цитокина МНК использовали коэффициент стимуляции (КС), который рассчитывали как отношение концентрации ФНО α в супернатантах, стимулированных лигандами МНК, к таковой в супернатантах, не стимулированных МНК. Относительные единицы вводили для выявления прироста уровня цитокинов под действием лигандов по отношению к спонтанной выработке цитокинов.

Спонтанная выработка ФНО α МНК периферической крови в 1-е сутки заболевания в основной группе (среднетяжелое течение ОП) составила 17,07 пг/мл, в группе сравнения (стандартная базисная терапия) – 32,52 пг/мл, на 6-е сутки заболевания спонтанная выработка ФНО α возрастала в обеих группах. У здоровых доноров спонтанная выработка составила 41,67 пг/мл. Высокая спонтанная выработка ФНО α (204 пг/мл) выявлена у 1 пациента основной группы с тяжелой формой ОП в 1-е сутки заболевания; на 6-е сутки, после проведения лечения с использованием лорноксикама, она понизилась до 83,87 пг/мл.

Лиганды TLR1/2 и TLR4 оказывали стимулирующее влияние на выработку ФНО α МНК у больных ОП обеих групп. У получавших стандартную базисную терапию выявлен высокий КС в ответ на ЛПС (16,07) и ПГ (27,58) по сравнению с показателем у здоровых доноров; на 6-е сутки КС понижался, но еще оставался высоким (КС_{ЛПС}=10,53; КС_{ПГ}=10,41). У больных основной группы КС на ЛПС в 1-е сутки также был выше, чем у здоровых доноров, но существенно ниже, чем в группе сравнения; на 6-е сутки заболевания этот показатель возрастал. Стимулирующее влияние лиганда TLR1/2 на выработку ФНО α МНК в основной группе было резко понижено, но на 6-е сутки повышалось, достигая значений, сравнимых с таковыми у здоровых доноров (табл. 2).

Таким образом, у больных ОП выявлено повышение эффекторной функции TLR1/2 и TLR4, определяемой по индуцированной лигандами TLR выработке провоспалительного цитокина ФНО α . Терапия лорноксикамом у больных ОП

приводит к снижению эффекторной функции как TLR4, так и TLR1/2 уже в 1-е сутки заболевания и нормализации этих показателей к 6-м суткам.

В результате проведенного исследования обнаружено, что лорноксикам достоверно ингибирует TLR-опосредованную выработку как провоспалительных цитокинов (ИЛ1, 6, 8, 12, ФНО α), так и противовоспалительного цитокина ИЛ10 МНК периферической крови у здоровых доноров *in vitro*. Значительное снижение уровня провоспалительных цитокинов служит аргументом в пользу выраженного противовоспалительного эффекта лорноксикама и его способности воздействовать не только на метаболизм арахидоновой кислоты, но и на пути трансдукции сигнала через активированные TLR.

В последние годы в связи с бурным развитием молекулярной биологии и иммунологии большое внимание уделяется изучению рецепторов врожденного иммунитета, в частности TLR, их роли в патогенезе иммуноопосредованных заболеваний человека, развитию воспаления [1, 13]. Активация этих рецепторов запускает внутриклеточные каскады, приводит к экспрессии транскрипционных факторов NF- κ B, IRF-3/7, индукции выработки широкого спектра провоспалительных цитокинов (ФНО α , ИЛ1, 6, 12, интерфероны- α/β и др.), развитию реакций врожденного иммунитета, контролю воспалительной реакции [2, 15]. В развитии ОП доказана роль TLR2 типов – 2-го и 4-го [8].

Лиганды, активирующие TLR, имеют экзогенное происхождение, например компоненты клеточной стенки бактерий: ПГ, ЛПС, флагеллин, ДНК микроорганизмов, вирусная РНК и многие другие. Выявлены также лиганды эндогенного происхождения, обозначенные как «сигналы опасности» (DAMP – от англ. Damage-Associated Molecular Pattern) – такие, как панкреатическая эластаза [7], белки теплового шока (HSP60, HSP70, фибронектин и др.) [5, 13].

При ОП в результате гибели большого количества собственных клеток организма происходит высвобождение значительных концентраций эндогенных лигандов, что приводит к активации сигнальных путей TLR, а также клеток иммунной системы и запускает выработку провоспалительных цитокинов.

Необходимость включения в комплексную терапию ОП препаратов, обладающих цитокинингибирующей активностью, очевидна. К сожалению, при проведении клинических испытаний цитокин-антагонистические стратегии лечения ОП, нейтрализующие один из цитокинов, оказались неэффективными [3]. Это объясняется тем, что цитокины обладают плейотропной активностью, и при недостатке одного цитокина его эффекты будет обеспечивать переизбыток других, т.е. мононаправленная цитокин-антагонистическая терапия не может быть эффективной.

Необходимость контроля развивающегося при ОП ССВР обуславливает поиск новых точек приложения терапевтических мероприятий, в том числе на молекулярном уровне. Данная область научных исследований – безусловно, одна из перспективных, требующих дальнейшего развития.

Необходимость контроля развивающегося при ОП ССВР обуславливает поиск новых точек приложения терапевтических мероприятий, в том числе на молекулярном уровне. Данная область научных исследований – безусловно, одна из перспективных, требующих дальнейшего развития.

Таблица 2

Выработка ФНО α МНК периферической крови у больных ОП

Группа обследованных	Спонтанная выработка ФНО α , пг/мл	КС _{ЛПС}	КС _{ПГ}
Доноры	41,67 (32,39–52,35)	3,74 (2,15–4,97)	4,89 (3,65–5,67)
Группа сравнения			
1-е сутки	30,52 (27,38–61,03)	16,07* (15,55–16,59)	27,58* (24,13–31,02)
6-е сутки	60,33 (48,56–72,11)	10,53* (8,34–12,71)	10,41* (9,81–11,01)
Основная группа			
1-е сутки	17,07 (14,71–20,32)	6,47 (4,37–8,56)	1,19* (1,09–1,28)
6-е сутки	29,62 (26,04–56,74)	11,38* (10,67–12,09)	5,05 (4,04–6,05)

Примечание. Данные представлены как Me (25–75% квантили); * – $p < 0,05$ по сравнению со здоровыми донорами.

Литература

1. Ковальчук Л.В., Хорева М.В., Варивода А.С. и др. Роль рецепторов врожденного иммунитета в развитии острого инфаркта миокарда // Журн. микробиол. – 2008; 4: 64–8.
2. Ковальчук Л.В., Хорева М.В., Варивода А.С. и др. Рецепторы врожденного иммунитета: подходы к количественной и функциональной оценке Toll-подобных рецепторов // Иммунология. – 2008; 4: 223–7.
3. Abraham E., Laterre P., Garbino J. et al. Lenercept Study Group. Lenercept (p55 tumor necrosis factor receptor fusion protein) in severe sepsis and early septic shock: a randomized, double-blind, placebocontrolled, multicenter phase III trial with 1,342 patients // Crit. Care Med. – 2001; 29: 503–10.
4. Bhatia M., Brady M., Shokuchi S. et al. Inflammatory mediators in acute pancreatitis // J. Pathol. – 2000; 90: 117–25.
5. Bianchi M. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger // J. Leukoc. Biol. – 2007; 81: 1–5.
6. Bone R., Balk R., Cerra F. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. ACCP/SCCM Consensus Conference Committee, American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine // Chest. – 1992; 101: 1644–55.
7. Hietaranta A., Mustonen H., Puolakkainen P. et al. Proinflammatory effects of pancreatic elastase are mediated through TLR4 and NF- κ B // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2004; 323 (1): 192–6.
8. Hong-Guang Li, Zong-Guang Zhou, Yuan Li. Alterations of Toll-like Receptor 4 Expression on Peripheral Blood Monocytes During the Early Stage of Human Acute Pancreatitis // Dig. Dis. Sci. Published online: 6 April 2007.
9. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity // Nat. Rev. Immunol. – 2001; 1: 135–45.
10. Moore F., Moore E. Evolving concepts in the pathogenesis of post injury multiple organ failure // Surg. Clin. North Am. – 1995; 75: 257–77.
11. Sabroe I., Parker L., Dower S. et al. The role of TLR activation in inflammation // J. Pathol. – 2008; 214 (2): 126–35.
12. Takeda K., Kaisho T., Akira S. Toll-like receptors // Annu. Rev. Immunol. – 2003; 21: 335–76.
13. Tsan Min-Fu, Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors // J. Leuk. Biol. – 2004; 76: 514–9.
14. Ulloa L., Tracey K. The «cytokine profile»: a code for sepsis // Trends Mol. Med. – 2005; 11: 56–63.
15. Weber C., Adler G. From acinar cell damage to systemic inflammatory response: current concepts in pancreatitis // Pancreatology. – 2001; 1: 356–62.

SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE SYNDROME AND A POSSIBLE WAY OF ITS CORRECTION IN ACUTE PANCREATITIS

Professor V. Gorsky, MD; M. Agapov, Candidate of Medical Sciences; M. Khoreva, Candidate of Medical Sciences

N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

High mortality rates from acute pancreatitis (AP) remain one of the relevant problems of current urgent surgery. A fatal outcome in the first disease period arises from the development of systemic inflammatory response syndrome and multiorgan dysfunction due to the release of the inflammatory mediators cytokines in peripheral circulation. The possibilities of pharmacological correction of complications in the first period of AP have been studied.

Key words: acute pancreatitis, systemic inflammatory response syndrome, cytokines, lornoxicam.