

Экспресс-диагностика клеточного звена иммунитета при некротической форме острого панкреатита

Кафедра военно-полевой хирургии ВМедФ в БГМУ, *НИИ эпидемиологии и микробиологии, **кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии БГМУ

Показано, что проведение «тройных» внутрикожных тестов с комбинациями ФГА, туберкулина, имунофана и полиоксидония у больных с некротическим панкреатитом помогают эффективно прогнозировать течение и исход процесса у конкретного пациента.

Актуальность проблемы острого панкреатита (ОП) удерживающего 3-е место после аппендицита и острого холецистита, среди хирургических заболеваний органов брюшной полости, остаётся высокозначимой из – за различных факторов [17, 28].

Несмотря на использование современных консервативных, эндоскопических и оперативных методик лечения, летальность сохраняется стабильно высокой от 4 до 12%, достигая 28-80% при деструктивных формах и присоединении гнойно-септических осложнений и сепсиса [6, 8, 9, 12, 19, 25].

Во многом неблагоприятный прогноз, обусловлен как объёмом поражения поджелудочной железы (ПЖ) и парапанкреатической клетчатки, так и присоединением вторичного индуцированного иммунодефицита (ВИД), наблюдающегося у 24-68% больных с некротическим панкреатитом [2, 13, 14, 26, 27].

Формированию ВИД способствуют существенные нарушения гемодинамического, метаболического, микроциркуляторного, нейроэндокринного гемостаза, а также медикаментозная депрессия вследствие массивных доз антибиотиков, глюкокортикоидов, длительная дис-и гипопропротеинемия за счёт вынужденного голодания, плазмопотери в ткани забрюшинного пространства, панкреатогенный транссудат, угнетения белково-синтезирующей функции печени, системная ферментемия [1, 4, 11, 23]. Не вызывает сомнения в формировании ВИД и факт общей специфической сенсibilизации организма с элементами аутоагрессии, отражающий воспалительно-деструктивные изменения тканей ПЖ [15].

В свою очередь, развивающийся вторичный иммунодефицит с угнетением Т-лимфоцитов проявляется ареактивностью, присоединением гнойно-септических процессов, сепсисом и является плохим прогностическим признаком [18, 20, 22].

Для оценки нарушений иммунной системы чаще всего используются гематологические показатели, объединённые с учётом двухуровневой или трёхэтапной системы скрининговых или развёрнутых тестов, направленных на распознавание, активацию, пролиферацию и дифференцировку иммуноцитов, изучение клеточной миграции, хемотаксиса и адгезии с позиции позитивной и негативной клеточной активации [3, 7].

Вместе с тем, представленные методики достаточно трудоёмки, занимают длительное время для получения окончательного результата, требуют дорогостоящего оборудования и реактивов, что зачастую снижают их диагностическую ценность для большинства лечебных учреждений практического здравоохранения.

В связи с данными обстоятельствами, для оценки функциональной активности Т-клеточного звена иммунитета в последнее время используют кожные пробы с туберкулином, стрептококковым и столбнячным анатоксинами и другими антигенами, основанные на реакции гиперчувствительности замедленного типа [3].

К основным преимуществам кожных тестов относятся: возможность оценки иммунного ответа *in vivo* в условиях естественного микроокружения и многообразия взаимодействий клеточных реакций; постановка и интерпретация без наличия сложного иммунологического оборудования и дорогостоящих реактивов. К основным недостаткам внутрикожных тестов следует отнести определённые трудности в их интерпретации, связанные как со снижением (отсутствием) ответа на определённые антигены вследствие иммуносупрессии, так и низкой сенсibilизацией организма на данные антигены. В связи с этим, в клинической иммунологии проведён пересмотр к оценке прежних подходов в сторону создания концепции «двойных» или «тройных» кожных тестов. Суть её заключается в одномоментной дифференциации у конкретного больного типа иммунного ответа, либо вследствие патологического процесса (в данном случае панкреонекроза), либо за счёт естественного состояния, вследствие отсутствия сенсibilизации, с помощью одновременного с антигеном (митогеном) введения иммуномодуляторов [10, 16].

Материал и методы

Работа основана на результатах обследования и лечения 21 больного с некротической формой острого панкреатита, находившихся на лечении в отделении общей хирургии УЗ «4-я клиническая больница им. Савченко с 2006 по 2008 гг. Контрольную группу составили 10 здоровых добровольцев (слушатели 6 курса военно-медицинского факультета).

Ведущим этиологическим фактором был алиментарный-71,4%; билиарный фактор составил соответственно 28,6% случаев.

Все больные в условиях хирургического и реанимационного отделений получили комплексное лечение, базисными компонентами которого являлись: инфузионно-дезинтоксикационная терапия, антиферментные, антибактериальные антисекреторные и спазмолитические препараты, введение соматостатина (окреотида) и его аналогов (по показаниям). При постановке диагноза панкреонекроза и его осложнений использовалась международная классификация ОП (Атланта, 1992 г.), дополненная рекомендациями IX Всероссийского съезда хирургов (2000 г.) и инструктивными стандартами Министерства здравоохранения Республики Беларусь (2003 г.).

Стандартная схема обследования пациентов включала данные объективного осмотра, общий и биохимический анализ крови, анализ мочи, фиброгастродуоденоскопию, ультразвуковое исследование, компьютерную томографию 12 больных (для уточнения масштаба и характера поражения поджелудочной железы, брюшинной клетчатки, органов брюшной полости).

Одному и тому же больному с некротической формой ОП одновременно выполняли три «тройных теста» (рис.1): 1) первый, путём введения 0,1 мл (или 2 мкг) фитогемагглютинина (или ФГА – неспецифический митоген Т-клеточной активации, производство РНА «Sigma» USA), отступая на 6-7 см от локтевого сгиба и 0,1 мл (или 5 туберкулиновых единиц ТЕ) туберкулина (РРД) – специфического митогена, производства НИИ вакцин и сывороток (СПб, РФ), отступая на 5 см кнаружи от места предыдущей инъекции и на 6-7 см от локтевого сгиба; 2) второй, путём одновременного введения 0,05 мл ФГА + 0,05 мл 0,005%-ного раствора имунофана (в

конечном объёме 0,1 мл), отступя на 5 см медиальнее от первого места введения ФГА; и 0,05 мл (2,5 ТЕ/РРД + 0,05 мл 0,005%-ного раствора имунофана (в конечном объёме 0,1 мл), отступя кнаружи на 4-5 см от пробы с ФГА и на 5 см дистальнее предыдущего теста с РРД; 3) третий, путём одновременного введения 0,035 мл ФГА + 0,0035 мл 0,005%-ного раствора имунофана + 0,035 мл 0,00006%-ного раствора полиоксидония (в конечном объёме 0,1 мл) – дистальнее на 5 см предыдущего теста с ФГА + имунофан; и 0,0035 мл РРД + 0,0035 мл 0,005%-ного раствора имунофана + 0,0035 мл 0,00006%-ного раствора полиоксидония (в конечном объёме 0,1 мл), отступя на 5 см кнаружи пробы с ФГА и на 5 см дистальнее предыдущего теста с РРД.

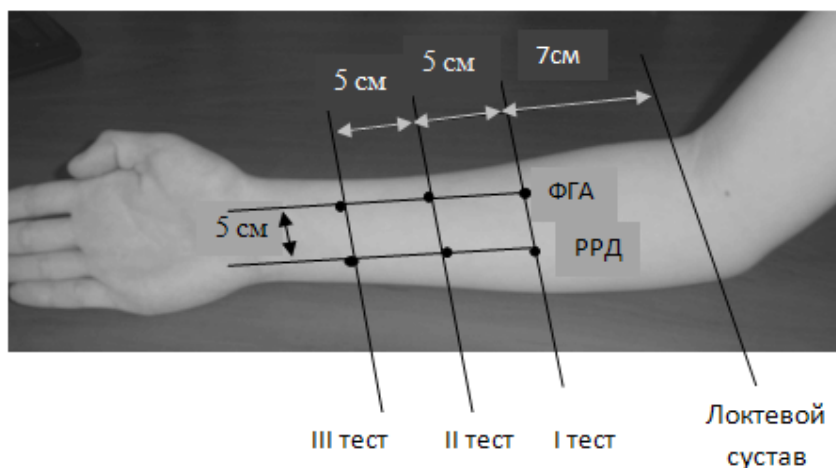


Рис. 1. Места постановки внутрикожных тестов

Результаты тестов учитывались через 24 часа для проб с ФГА и через 72 часа для проб с РРД путём измерения максимального диаметра внутрикожной папулы (инфильтрата) в направлении, перпендикулярном оси введения препаратов. Диаметр папулы до 5 мм на антигены свидетельствовал об анергии, в пределах 6-11 мм – о нормергии, более 15 мм – о гиперергии.

Результаты и обсуждение

Проведение исследования в контрольной группе (n=10) рис.2, выявили средний диаметр папулы на введение ФГА $5,73 \pm 0,29$ мм, на РРД – $7,58 \pm 0,45$ мм. При введении в систему кожного ответа с ФГА имунофана (в соотношении 1:1) отмечалось недостоверное повышение ($p > 0,05$) реактивности пациентов контрольной группы до $5,92 \pm 0,34$ мм; имунофана и полиоксидония (в соотношении 1:1:1) – до $6,21 \pm 0,47$ мм. При добавлении в систему кожного теста с РРД имунофана (в соотношении 1:1) у пациентов контрольной группы диаметр внутрикожного инфильтрата достигал $8,17 \pm 0,62$ мм ($p > 0,05$), а при одновременном введении имунофана и полиоксидония (в соотношении 1:1:1) – до $9,30 \pm 0,47$ мм.

При этом у пациентов контрольной группы аллергических реакций на ФГА и РРД – не выявлено, а интервал значений в определяемых тестах существенно не отличался между собой ($p > 0,05$).

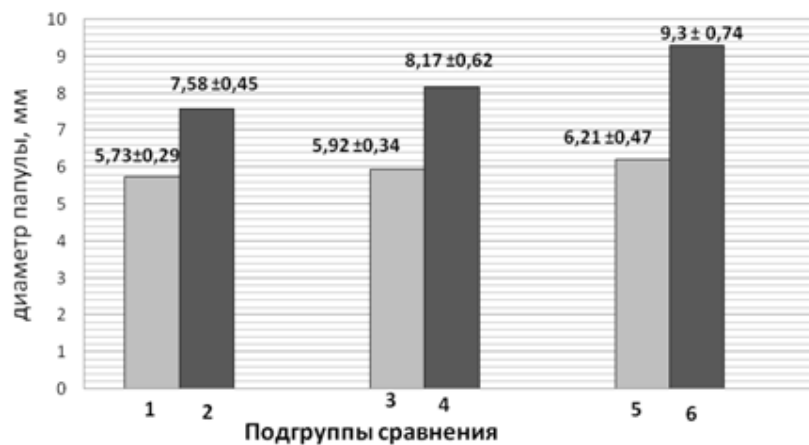


Рис.2. Динамика размеров внутрикожных тестов у пациентов контрольной группы (n=10) (M±m).

- 1 – ФГА
- 2 – РРД
- 3 – ФГА + имунофан (1:1)
- 4 – РРД + имунофан (1:1)
- 5 – ФГА + имунофан + полиоксидоний (1:1:1)
- 6 – РРД + имунофан + полиоксидоний (1:1:1)

У пациентов с некротизирующим панкреатитом (таб. 1) в 71,4% случаях выявлена анергия в пробах с ФГА, и в 57,1%-в пробах с РРД, что достоверно свидетельствовало об угнетении Т-клеточного звена иммунитета, особенно выраженном при присоединении гнойно-септических осложнений.

Введение имунофана в кожные тесты с АУФ приводило к недостоверному снижению анергии ($p > 0,05$) за счёт одновременного увеличения гипо/нормергии и снижения гиперергических реакций (в 3,01 раза; $p < 0,01$).

Добавление имунофана к пробам с РРД (в соотношении 1:1) более существенно снижало анергию (в 1,05 раза; $p < 0,05$), а также гиперергию (в 2,26 раза; $p < 0,01$) за счёт увеличения в 2,52 раза гипо/нормергических тестов ($p < 0,05$). Имунофан при этом повышал как диаметр внутрикожных папул (по отношению к пробам с РРД) с $7,58 \pm 0,45$ до $9,60 \pm 0,34$ мм, так и уменьшал реактивность, определяемую по среднему диаметру гиперергических проб – с $17,8 \pm 0,9$ до $16,2 \pm 0,52$ мм.

Таблица 1. Процентное распределение больных с некротическими формами панкреатита при различных типах реактивности по результатам внутрикожных тестов с добавлением имунофана (M ± m)

Митоген + иммуномодулятор	Тип реактивности (%)		
	Анергия	гипо/нормергия	гиперергия
ФГА	71,4 ± 8,43	19,1 ± 3,39	9,5 ± 1,21
ФГА + имунофан	52,45 ± 6,2	42,8 ± 2,86 P*	4,75 ± 5,71 P**
РРД	57,1 ± 6,15	28,3 ± 3,58	14,3 ± 1,92
РРД + имунофан	47,5 ±	48,3 ± 6,87 P*	4,2 ± 1,3

Примечания: P*-уровень значимости при сравнении показателей с группой ФГА и РРД ($p < 0,05$).

P**,-то же самое при $p < 0,01$.

Присоединение к внутрикожным пробам с ФГА и имунофаном комплексного иммуномодулятора многоточечного взаимодействия – полиоксидония в соотношении 1:1:1 (табл. 2) способствовало увеличению числа нормергии в 2,17 раза ($p < 0,05$) за счёт снижения в 1,7 раза ($p < 0,05$) анергических и в 3,4 раза ($p < 0,01$) гиперергических тестов.

Введение в тест с РРД с имунофаном полиоксидония в соотношении 1:1:1 сопровождалось достоверным увеличением числа нормергических ответов (в 3,75 раза, $p < 0,001$) при одновременном снижении анергии в 2,49 раза ($p < 0,01$) и отсутствии гиперергических реакций.

Таблица 2. Процентное распределение больных с некротическими формами панкреатита при различных типах реактивности по результатам внутрикожных тестов с добавлением имунофана и полиоксидония ($M \pm m$)

Митоген + иммуномодулятор	Тип реактивности (%)		
	Анергия	гипо/нормергия	Гиперергия
ФГА	71,4 ± 8,43	19,1 ± 3,39	9,5 ± 1,21
ФГА + имунофан + полиоксидоний	33,5 ± 2,7 P*	62,3 ± 5,35 P*	4,2 ± 1,64 P**
РРД	57,1 ± 6,15	28,3 ± 3,58	14,3 ± 1,92
РРД + имунофан + полиоксидоний	28,6 ± 3,71 P*	71,8 ± 6,92 P**	-

Примечание – Условные обозначения такие же, как в таблице 1.

Анализ результатов с использованием группирования больных некротическими формами панкреатита в зависимости от ответа на ФГА и его комбинации с другими митогенами (рис.3) показал, что включение в кожные тесты имунофана при анергии повышало диаметр папулы с $2,2 \pm 0,3$ мм до $3,4 \pm 0,52$ мм, а добавление полиоксидония – до $4,8 \pm 0,87$ мм ($p < 0,05$).

При нормергическом ответе добавление имунофана сопровождалось повышением диаметра тестов до $5,35 \pm 0,2$ мм, а введение дополнительно полиоксидония до $5,42 \pm 0,34$ мм, хотя данные показатели были ниже аналогичных значений контрольной группы ($5,92 \pm 0,34$ и $6,21 \pm 0,47$ мм соответственно).

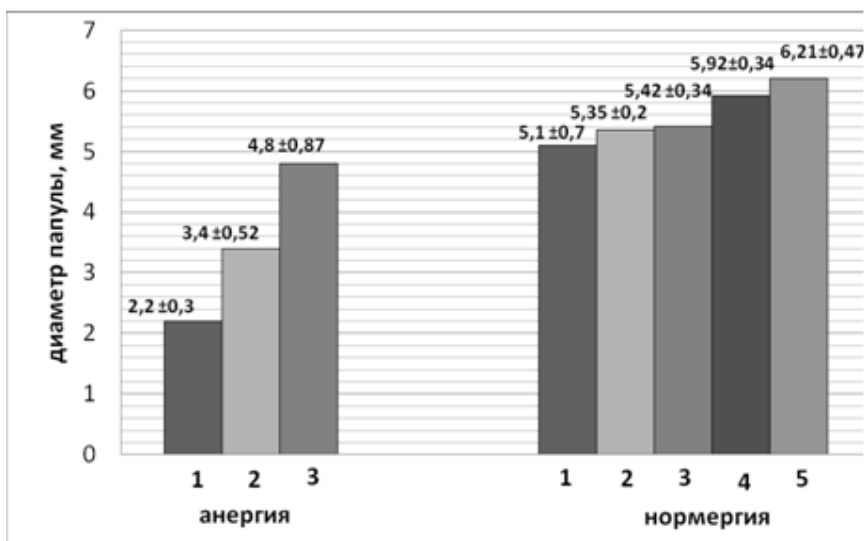


Рис.3. Влияние имунофана и полиоксидония на реактивность больных с некротическими формами панкреатита в кожных тестах с ФГА ($M \pm m$).

- 1 – ФГА (больные с НП)
 - 2 – ФГА + имунофан (больные с НП)
 - 3 – ФГА + имунофан + полиоксидоний (больные с НП)
 - 4 – ФГА + имунофан (контроль)
 - 5 – ФГА + имунофан + полиоксидоний (контроль)
- НП-некротический панкреатит

Анализ с использованием группирования больных в зависимости ответа на РРД в группе больных нормергическим типом реагирования (рис. 4) показал что включение только имунофана увеличивало диаметр кожной папулы с $5,8 \pm 0,21$ до $6,3 \pm 0,56$ мм, а введение к данной комбинации ещё и полиоксидония, сопровождалось увеличением диаметра папулы до $7,8 \pm 0,19$ мм. Вместе с тем, у пациентов данной подгруппы даже после введения дополнительных митогенов показатели оставались ниже, чем в контрольной группе ($8,17 \pm 0,62$ и $9,3 \pm 0,74$ мм соответственно).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о существенном повреждении клеточного звена иммуногенеза у больных с некротическими формами панкреатита, что подтверждается угнетением общей (в пробах с ФГА) и специфической (на РРД – туберкулин) реактивности.

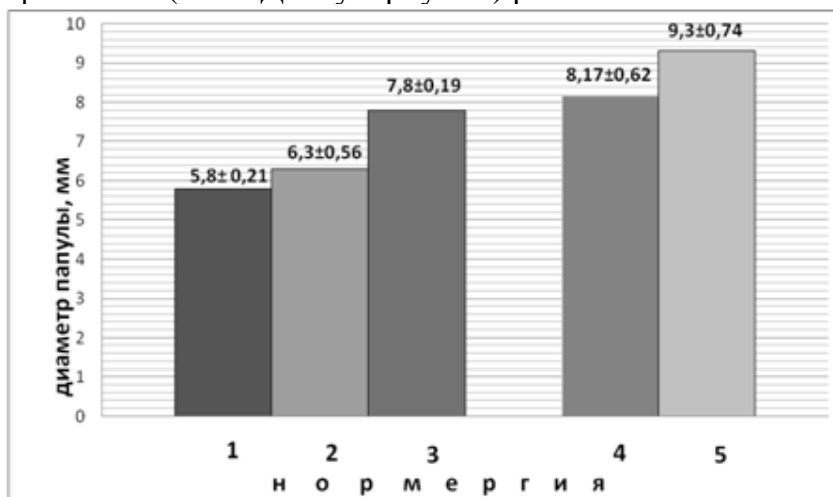


Рис. 4. Влияние имунофана и полиоксидония на реактивность больных с некротическими формами панкреатита в кожных тестах с РРД ($M \pm m$).

1-РРД (больные с НП)

2-РРД + имунофан (больные с НП)

3-РРД + имунофан + полиоксидоний (больные с НП)

4-РРД + имунофан (контроль)

5-РРД + имунофан + полиоксидоний (контроль)

НП-некротический панкреатит

Для дифференциальной диагностики анергии, следствие нарушения механизмов презентации и ко-стимуляции (в реакциях с использованием антигенпредставляющих клеток АПК), или слабой экспрессии молекул АПК, осуществляющих передачу второго сигнала, а также неадекватных стимулов со стороны иммуноцитов микроокружения, способствующих преимущественному развитию гуморального ответа (за счёт стимуляции Th2-хелперов) в кожные тесты введены дополнительные митогены: имунофан и полиоксидоний. При этом в группе больных с анергическим типом реакций, имунофан, путём образования в цитоплазме вторичных мессенжеров: цАМФ, ионов кальция, инозиттрифосфата (ИТФ), диацилглицерола и др., способствует трансформации лимфоидных клеток с тенденцией к восстановлению баланса Т-лимфоцитов и их функциональной активности. Ранее было установлено, что иммуномодулирующий эффект имунофана проявляется в режиме ультрамалых доз (порядка 10-10-10-12 мкг), позволяющих добиться усиления внутриклеточного сигнала в 106-108 раз [5]. При гиперергическом типе препарат угнетал пролиферативную функцию, за счёт чего, гиперактивные процессы среди отдельных лимфоцитов возвращались к значениям, близким к норме. Другими словами, за счёт действия имунофана осуществлялось дистанционное управление клетками периферической иммунной системы и вызывалась стимуляция их дифференцировки и созревания. В свою очередь, активированные иммуноциты, посредством цитокинов, инициировали пролиферацию и созревание субпопуляций Т-и В-лимфоцитов [21, 24].

Дополнительное введение в схему кожных тестов комплексного иммуномодулятора, осуществляющего кооперацию иммуноцитов – полиоксидония, способствовало переключению антигенстимулированных CD4+ Т-лимфоцитов на выработку Th1-хелперов, способствующих усилению клеточного иммунного ответа, что проявилось увеличением числа нормергических реакций при одновременном снижении анергии. В группе больных с гиперергическим типом реагирования, полиоксидоний за счёт индукции м-РНК для ИЛ-1, ИЛ-6 и подавления экспрессии для ФНО- α и ИЛ-8, проявлял свойства индуктора Th2-иммунного ответа, что способствовало снижению гиперергии в сторону нормергической реактивности (в тестах с ФГА).

Выводы

1. При некротических формах острого панкреатита в модифицированных тестах в 71,4 и 57,1% случаев выявлена анергия, свидетельствующая о существенном угнетении клеточного иммунитета, что может служить оценкой инфицирования, течения и исхода некротического панкреатита.

2. Введение в пробы имунофана в режиме ультрамалых доз, за счёт равнонаправленного характера его действия, отменяло локальную анергию более чем в 23,9% случаев в реакциях с РРД, при росте числа нормергических реакций на 14,5% и 29,2% соответственно. Дополнительное включение полиоксидония повышало

эффективность тестов за счёт 42,8%-ного снижения анергических и отсутствия гиперергических проб (при общем увеличении нормергической реактивности на 52,7%).

3. Применение имунофана и полиоксидония не только повышает эффективность кожных проб, но и может явиться основой предварительного прогноза эффективности их применения у конкретного больного с ОП.

Литература

1. Всесоюзная научная конференция «Актуальные вопросы хирургии поджелудочной железы»: тезисы докладов / В. С. Веселов [и др.]. Киев, 1988. С. 14.
2. Имунные и ферментные нарушения у больных острым панкреатитом / Б.С. Брискин [и др.] // Хирургия. 2001. № 7. С. 21 – 24.
3. Клиническая иммунология / под ред. А. В. Караулова. М.: МИА, 1999. 604 с.
4. Лаптев, В. В. Иммунологические аспекты острого панкреатита / В. В. Лаптев, Г. А. Пивазян // Хирургия. 1986. № 3. С. 142 – 150.
5. Лебедев, В. В. Имунофан – синтетический пептидный препарат нового поколения: иммунологические и патогенетические аспекты клинического применения / В. В. Лебедев // Иммунология. 1999. № 1. С. 25 – 30.
6. Лечение острого деструктивного алиментарного панкреатита / Н. Н. Малиновский [и др.] // Хирургия. 2000. № 1. С. 4 – 7.
7. Никулин, Б. А. Тактика использования иммунологических методов исследования при различных болезнях / Б. А. Никулин // Военно-медицинский журнал. 1994. № 1. С. 26 – 31.
8. Острый панкреатит как проблема urgentной хирургии и интенсивной терапии / В.С.Савельев [и др.] // CONSILIUM MEDICUM. 2000. Т. 2. № 9. С. 302 – 306.
9. Острый панкреатит: пособие для врачей / М.Н.Филимонов [и др.]; под ред. В. С. Савельева. М: НЦС – РАМН, 2000. 60 с.
10. Оценка иммунологического статуса организма по кожным пробам фитогемагглютинином и циклоспорином А: метод. рекомендации / Л. П. Титов [и др.]. Минск: МГМИ, 1990. 20 с.
11. Прокопенко, Л. Г. Развитие вторичного иммунодефицита при остром панкреатите / Л. Г. Прокопенко, Н. А. Быстрова // Патологическая физиология. 1991. № 1. С. 54 – 57.
12. Пути улучшения результатов лечения больных панкреанекрозом / А. А. Кузнецов [и др.] // Хирургия. 2008. № 5. С. 40 – 45.
13. Савельев, В. С. Панкреанекроз. Состояние и перспектива / В. С. Савельев, В. А. Кубышкин // Хирургия. 1993. № 6. С. 22 – 28.
14. Тарасенко, А. В. Программа комплексной оценки иммуногенеза и пути его патогенетической коррекции у больных деструктивными формами острого панкреатита: инструкция по клиническому применению: утв. Нач. ВМУ МО / А. В. Тарасенко, С. А. Алексеев. 2008. 15 с.
15. Тарасенко, В. С. Особенности иммунного статуса при остром панкреатите / В. С. Тарасенко, А. И. Смолягин, В. А. Кубышкин // Хирургия. 2000. № 8. С. 51 – 55.
16. Титов, Л. П. Способ определения состояния Т-клеточного иммунитета: авторское свидетельство № 1455315 СССР / Л. П. Титов, А. Н. Батян // Открытия и изобретения. 1989. № 4. С. 211.

17. Филин В. И. Неотложная панкреатология: справочник для врачей / В. И. Филин, А. Л. Костюченко. Ст-Петербург: Питер, 1994. 410 с.
18. Шугаев, А. И. / А. И. Шугаев, Л. Ф. Шабанова // Вестник хирургии. 1993. № 3 – 4. С. 15 – 24.
19. CT-guided aspiration of superected pancreatic infection: bacteriology and clinical outcome / Banrs P.A. [en al] // Int J. Pancreatology. 1995, Dec; 18; 3; P. 265 – 270.
20. Curley, P.I. / P.I / Curley // Ann. R. Coll. Surg Engl., 1996. 78: 6; P. 531 – 535.
21. Hadden, I.W. Classification of immunotherapeutic agents / I.W.Hadden. // Dev. Biol. Stand.-1992, № 77, P. 5 – 15.
22. Hamilton, G. / G.Hamilton, S.Hofbamer, B.Hamilton // Scand. I. Infect Dis.; 1992; 24; 3; P. 361 – 368.
23. Huang, C. Regulation and function of mast cell proteases in inflammation / C. Huang, A.Sali, R.Stewens // I.Clin. Immunol., 1998, Vol 18, P. 169 – 183.
24. Lumdblad, R. Granulocyte colone-stimulating factor improves myelopoiesis and host defense in fulminant intra-abdominal sepsis in rats / R.Lumdblad [et al] // Shor, 1995; Vol. 4. № 1. P. 68 – 73.
25. Martinez, I.F. Antibioteciterapia profilactica pancreatit aquda Rev. / I.F.Martinez, I.M.Palason, M.Peterz-Mateo // Esp Enferm Dig, 1997; 89; 10; P. 781 – 785.
26. Schulz, H.U. Zellulare und humorale tunktionen bei der akuten Pancreatitis / H.U. Schulz [et al] // Wien Med. Wschr. 1997; 147; 1; P. 10 – 13.
27. Tanaka, N. Interleukin – 1 receptor antagonist modifies the changes in vital organs induced by acute necrotizing pancreatitis in rat experimental model / N.Tanaka [et al] // Crit. Care Med. 1995; 23; 5; P. 901 – 908.
28. Widdison, A.L. Pathogenesis of pancreatic infection / A.L.Widdison // Ann. R. Coll. Surg Engl., 1996. 78; 4; P. 350 – 353.