

УДК: 616.379-002.2-053.89

Хронический панкреатит в пожилом возрасте: об участии некоторых звеньев патогенеза в течении заболевания

Т.Н. Христич

Буковинский государственный медицинский университет

Ключевые слова: хронический панкреатит, возраст, цитокины, пероксидация липидов, гемостаз.

В настоящее время проблема патогенеза и прогрессирования хронического панкреатита (ХП) остается не до конца решенной, поэтому актуальной, особенно в пожилом возрасте. Роль апоптоза как патогенетического звена развития и прогрессирования гастроэнтерологических заболеваний стала обсуждаться недавно [5] и более всего разрабатывается в гепатологии [2].

Апоптоз (от греческого - "опадание лепестков цветов или листьев с деревьев") представляет собой запрограммированную гибель клетки, итогом чего в организме является удаление определенных клонов дифференцированных клеток или избыточного биологического материала.

Апоптоз выражается дегенерацией ДНК, распадом клеток на фрагменты, сохранением целостности внешней мембраны. Поэтому он не сопровождается развитием воспаления и не вызывает повреждения других клеток и тканей. К основным морфологическим признакам апоптоза относят вакуолизацию и конденсацию цитоплазмы и хроматина; клеточную фрагментацию на апоптотические тельца, а также тельца, содержащие остатки и клеточные органеллы [11]. На биохимическом уровне этот процесс сопровождается угнетением включения глюкозы и нуклеозидов в клетку; снижением синтеза липидов, белков, АТФ; активацией эндонуклеаз и фрагментацией ДНК. Таким образом, апоптоз является центральным механизмом, регулирующим каче-

ственный и количественный состав клеточных популяций в многоклеточных организмах.

В каскаде реакций, запускающих апоптоз, принимают участие (а по данным некоторых авторов - играют определяющую роль) митохондриальные факторы, высвобождающиеся в цитоплазму при нарушении целостности митохондриальной мембраны [1].

Индукторами апоптоза могут быть оксидативный стресс (особенно у пожилых), активация протеаз, дисрегуляция обмена кальция, цинка, нарушения межклеточных контактов [10].

В зависимости от пусковых факторов и типа клеток существует многообразие сигнальных путей, активирующих апоптоз. Его могут индуцировать цитотоксические лимфоциты, не секреторные, индуцированные лигандами, медиаторными рецепторами, механизмы, или секреторные перфорины и гранзимы. В ряде исследований показано, что ФНО α стимулирует процесс апоптоза.

В здоровом организме апоптоз способствует удалению поврежденных клеточных структур, восстановлению целостности тканей и носит адаптивный характер.

При прогрессировании ХП, а также старении уменьшается количество жизнеспособных клеток. На поверхности клеток органа экспрессируются так называемые рецепторы смерти,

при связывании с которым фактор некроза альфа запускает процесс апоптоза, в том числе через каспазный каскад, усиливая процессы СРОЛ, активируя окислительный стресс. Фермент этого каскада-каспаза 3 - индуцирует генетическую программу гибели клетки.

Клеточные рецепторы имеют прямое отношение к апоптозу. Наиболее изучены Fas-рецепторы. Они относятся к семейству рецепторов фактора некроза опухоли. АРО-1 (Fas/CD95) - является рецептором клеточной поверхности, рецептором апоптоза. Взаимодействие Fas-рецепторов с Fas-лигандами (лиганды чаще всего активируются на лимфоцитах) или столкновение со стимулирующими антителами через $\text{IL1}\beta$ -превращающий фермент инициирует апоптоз в клетках млекопитающих [6]. Было установлено, что чувствительность клеток к Fas-индуцированной гибели зависит от внутриклеточных антиоксидантов.

Показано, что цитокины, стероидные гормоны и другие соединения, индуцирующие апоптоз, стимулируют продукцию активных форм кислорода, снижают содержание клеточных антиоксидантов, повреждают ДНК, нарушают функцию митохондрий, изменяют липидный состав мембран (за счет активации радикальных окислительных процессов). Активизация СРОЛ может быть причиной интоксикации и усугубления процессов апоптоза эндотелия сосудов и инактивации оксида азота в эн-

дотелии.

Параллельно с повреждением липидного слоя, модифицируются мембранные белки [5], дополнительно образуются жесткие связи между разнообразными доменами протеиновой нити (вследствие необратимого взаимодействия вторичных продуктов свободно-радикального окисления с аминокислотами аминокислот). Изменяется кинетическая способность белковых молекул.

Некоторые цитокины (как *in vivo*, так и *in vitro*) могут индуцировать или ингибировать апоптоз. В этом плане наиболее изученным является TNF α , выделенный из сыворотки крови больных с бактериальными инфекциями, у которых наблюдалась регрессия опухоли. TNF α – представляет собой тример, состоящий из 17 КДА и действующий через специфические рецепторы на поверхности клеток. Синтез TNF α осуществляется в ответ на бактериальный эндотоксин. Он вызывает быстрый рост внутриклеточного уровня активных форм кислорода, при этом чувствительность или резистентность клеток к TNF α коррелирует со сниженным или повышенным уровнем супероксиддисмутазы в них.

Одним из возможных механизмов образования активных кислородных метаболитов при действии TNF α есть нарушение функции митохондриальной цитохром-с-оксидазы. Это приводит к энергетическому дисбалансу в митохондриях, а в дальнейшем → к снижению синтеза АТФ, усилению генерации активных кислородных метаболитов и развитию оксидативного стресса.

Таким образом, митохондрии представляют собой не только источник, но и основную мишень действия АФК (активных форм кислорода). В условиях оксидного стресса озон активирует фосфолипазу А₂, что способствует изменению липидного состава мембран митохондрий.

Кроме того, следует помнить, что TNF α принимает участие в следующих реакциях:

- ▶ индуцирует NO нейтрофилами;
- ▶ повышает образование ИЛ-1, замедляет реакцию гладких мышц сосудов на сосудосуживающие стимулы;
- ▶ повышает адгезию нейтрофилов

к сосудистой стенке и миграцию их в в пожилом возрасте. ткани;

▶ вызывает структурные и метаболические нарушения эндотелиальных клеток;

▶ повышает проницаемость биологических мембран за счет высвобождения БАВ. В зоне воспаления концентрируется большое количество перекиси водорода, активированных радикалов кислорода, эластазы;

▶ стимулирует образование эйкозаноидов;

▶ при взаимодействии с лейкотриенами приводит к поражению легких;

▶ вместе с ИЛ-1 индуцирует экспрессию рецепторов холецистокинина в ацинарных клетках;

▶ увеличивает объем ацинарных клеток приблизительно на 20% за счет стимуляции захвата клетками аминокислот натрий-зависимыми переносчиками (накопление натрия приводит к отеку клеток и отеку ПЖ).

В механизмах воспаления ни в одном органе протеолитическая агрессия не имеет такого значения, как в ПЖ. Это связано с насыщенностью железы протеазами, с активации которых начинается воспалительный процесс.

Начальная фаза обострения заключается в активации трипсина из трипсиногена с последующим участием лизосомальных ферментов, высвобождающихся из нейтрофилов, протеаз пораженных ацинарных структур. При этом протеолитические ферменты разрушают эндотелиальные клетки, тканевые и плазменные белки, изменяется активность факторов свертывания крови, процесс фибринолиза, калликреин-кининовый механизм, активизируется система комплемента (через пропердиновый механизм). Описанные механизмы стимулируют апоптоз.

Исходя из изложенного, целью нашей работы было изучить взаимосвязь между апоптотической активностью лимфоцитов периферической крови, перекисидацией липидов, белков, протеолитической, фибринолитической активностью плазмы, а также состояние антиоксидантной системы защиты (АОС) и уровень TNF α у больных хроническим панкреатитом

Методы обследования. Обследовано 82 больных с хроническим панкреатитом (ХП) в возрасте от 50 до 72 лет и 25 практически здоровых лиц пожилого возраста. Внешнесекреторную функцию ПЖ исследовали по общепринятой методике (стимуляция проводилась хлористоводородной кислотой и оливковым маслом). Ультрасонографическое обследование проводилось аппаратом "Ultramark - 9". Критерием ХП считали неровность контуров и снижение эхо-сигналов, увеличение органа (особенно головки), наличие очагов фиброза, изменения главного протока ПЖ. Наряду с клиническим исследованием использовали биохимические. Состояние ПОЛ изучали согласно метода Т.А. Волчагорского и соавт. (1989 г.), содержание малонового альдегида (МА) – по Ю.А. Владимирову и А.И. Арчакову (1972) [3]. Содержание восстановленного глутатиона (ГВ) по О.В.Травиной (1955г) в модификации И.Ф. Мещишена [9], И.В. Петровой (1983) [7]. Протеолитическую активность плазмы крови определяли по лизису азоальбумина, азоказеина, азокола ("Simko LTD", Украина). Интенсивность окислительной модификации белков определяли по методу Е.Е. Дубининой и соавт. (1995г) [4] в модификации И.Ф. Мещишина (1998) [8]. Готовность организма к апоптозу определяли иммунофлюоресцентным окрашиванием лимфоцитов периферической крови с помощью моноклональных антител СД 95 (Fas/APO-1) и FITC – меченых мышинных антител, оценивая процент флюоресцирующих клеток, сывороточный уровень TNF α исследовали с помощью набора реагентов ProConTNF- α (ООО "Протеиновый контур").

Статистический анализ проводился с использованием методов вариационной статистики с помощью программы "Excel 2000".

Результаты исследования. При изучении особенностей перекисидации липидов у обследуемых больных установлено повышение интенсивности ПОЛ по данным малонового альдегида (МА без инициации – 8,72±0,18 мкмоль/л по сравнению с практически здоровыми (5,75±0,23 мкмоль/л), с инициацией НАДФН₂ – 11,02±0,36 мкмоль/л (у практически здоровых 9,38±0,29 мкмоль/л). Следует отметить, что повышение показателей МА коррелировало с тяжестью и активностью течения ХП. Это поз-

волило нам рассматривать данный показатель в качестве маркера воспалительной реакции.

Мы предполагали, что активация ПОЛ действует цитотоксически, стимулирует синтез коллагена, параллельно активирует фосфолипазу А₂ и повышает концентрацию тромбоксана А₂ у данной группы больных. Описанные выше патогенетические звенья запускают механизмы активации тромбоцитов, вазоконстрикции, сокращения эндотелиальных клеток, оголения их мембраны, на которых адгезируются тромбоциты. К тому же, нарушение гомеостаза сопровождается снижением или угнетением фибринолитической активности плазмы за счет снижения плазминогена, что ухудшает течение ХП, приводя к развитию полиорганной недостаточности и осложнениям.

При изучении состояния окислительной модификации белков (ОМБ) по альдегидо- и кетонпроизводным нейтрального характера было установлено повышение их показателей ($2,35 \pm 0,11$ мкмоль/л белка, у здоровых – $1,73 \pm 0,08$ мкмоль/л белка ($p > 0,05$)). Показатели же альдегидо- и кетонпроизводных основного характера практически не изменились. Полученные данные свидетельствуют о повышенной чувствительности белков к протеолизу, поскольку фрагментированные и денатурированные белки являются субстратом для внутриклеточных протеаз, и указывает на активацию протеолиза у больных. Таким образом, у данных больных отмечается активация протеолиза с максимальным повышением интенсивности протеолитической деградации высокомолекулярных белков.

По-видимому, существует несколько механизмов, которые объясняют сложившуюся ситуацию. К ним относятся:

- ▶ накопление окисленных модификаций белков, продуктов ПОЛ;
- ▶ повышение активности протеаз в силу различных причин (например, вследствие нарушения проницаемости ацинарных клеток с феноменом "уклонения" ферментов ПЖ в кровь как результат дегрануляции нейтрофилов или генетического нарушения структуры протеаз трипсинового (серинового типа);
- ▶ снижение активности ингибиторов протеаз (вследствие генетически запрограммированного нарушения

синтеза α₁-антитрипсина, нарушения синтетической функции печени при сопутствующей гепатобилиарной патологии, а также в результате дисфункции эндотелия сосудов в пожилом возрасте).

Все перечисленное выше способствует повышению апоптотической активности, что мы и наблюдали при исследовании СД95 [12]. Исходя из этого, можно объяснить атрофию ацинусов при одновременно активной пролиферации клеток соединительной ткани (как менее дифференцированной) и дальнейшее развитие фиброза либо склероза железы у лиц пожилого возраста.

У обследованных больных выявлено повышение лизиса низкомолекулярных белков ($p < 0,05$) и интенсификация протеолитической деградации высокомолекулярных белков, указывающие на активацию плазменного протеолиза.

Изменение коллагеназной активности были разноплановыми, что способствовало выделению двух групп больных (35 человек со снижением и 47 – с повышением такой активности). При клиническом анализе оказалось, что у больных с легким течением ХП наблюдается снижение ($0,48 \pm 0,05$ мл/час, практически здоровые – $0,84 \pm 0,04$ мл/час, $p < 0,05$) показателей, свидетельствующих о повышении синтеза коллагеновых волокон и развитии фиброза или склероза. У больных со средней тяжестью и тяжелым течением ХП отмечалось повышение активности ($1,98 \pm 0,05$ мл/час). Это может быть связано с преобладанием процессов деструкции ткани ПЖ над фиброзом или склерозом. Полученные показатели также могут служить критерием двух различных лечебных тактик.

Активация пероксидации липидов у больных ХП в пожилом возрасте сопровождается нарушением функционирования системы восстановленного глутатиона (ВГ). Именно она является основным источником для восстановительных эквивалентов в вопросе регуляции окислительного стресса в клетке. Согласно полученным данным ВГ достоверно снижается ($2,17 \pm 0,05$ мкмоль НАДФН₂ за 1 мин на 1гНв, у практически здоровых – $2,75 \pm 0,06$ мкмоль НАДФН₂ за 1 мин на 1гНв). Ранее нами (Христинич (1996)) было показано, что состояние глутатионовой системы защиты является критерием компенсации или декомпенсации механизмов адаптации,

критерием истощения защитных сил организма в ответ на действие хронического стресса, каковым является ХП у данной группы больных. Поскольку ВГ по данным некоторых авторов (7) является ингибитором апоптоза, то его снижение при значительной интенсификации ПОЛ, ОМБ, активации протеолитической системы, может указывать на значительную роль апоптоза в развитии и прогрессировании ХП у лиц пожилого возраста.

При исследовании апоптотической активности лимфоцитов отмечается повышение поверхностной экспрессии СД95 на них ($p < 0,05$), что свидетельствует в пользу готовности клеток ПЖ к апоптозу, за счет лиганд-независимой стимуляции токсическими гидрофобными желчными кислотами, либо за счет активации каспаз-3 или каскада протеолиза.

Что касается TNF-α, то уровень его достоверно повышался. При прогрессировании, хронизации процесса излишняя продукция TNF-α тормозит поступление в организм витаминов, микроэлементов, способствует изменению метаболизма железа и развитию анемии, к тому же, повышение его уровня нарушает митохондриальное дыхание и стимулирует апоптоз. Доказательством тому может служить достоверное повышение экспрессии СД95, которое ассоциируется с легким течением [5]. По мере прогрессирования заболевания в пожилом возрасте данный уровень уменьшается, в то время как нейтрофильная инфильтрация и некроз ацинарных клеток приводят к тяжелому течению ХП (часто с летальным исходом).

Анализ динамики показателей TNF-α и СД95 в зависимости от степени тяжести заболевания, говорит о разноплановости его действия на апоптоз лимфоцитов периферической крови, подтверждая данные литературы о том, что TNF-α включает как сигналы к апоптозу, так и механизмы выживания клетки в зависимости от соответствующих факторов. Например, TNF-α запускает процесс, ведущий к апоптозу или некрозу в зависимости от концентрации его в крови.

Если допустить, что повышение апоптотической активности лимфоцитов свидетельствует о повышении апоптотической активности клеток ПЖ, то апоптоз ацинарных клеток уменьшает повреждение тканей при тяжелом течении. Поэтому лечение данной группы больных должно

быть направлено на перевод некроза в процесс апоптоза, возможно, путем воздействия на TNF- α , ПОЛ, ОМБ, протеолитическую активность.

Выводы

♦ Высокое содержание в крови продуктов ПОЛ и ОМБ, дестабилизация системы протеаз-антипротеаз и повышение уровня провоспалительных цитокинов у больных ХП в пожилом возрасте приводит к повреждению ацинарных клеток и активации апоптоза, а в дальнейшем – к развитию фиброза или склероза ПЖ.

♦ Исследование изменений в системе протеолиза, ПОЛ, ОМБ, изучение апоптотической активности лимфоцитов периферической крови и уровня TNF- α может служить допол-

нительным прогностическим показателем активности хронического воспалительного процесса в ПЖ и дает возможность прогнозировать тяжесть течения и адекватность медикаментозного лечения.

Литература

1. Аруин А.П. Апоптоз при патологических процессах в органах пищеварения // Клиническая медицина. - 2000. - №1. - С.5-11
2. Буевров А.О. Иммунологические механизмы повреждения печени // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 1998. - Т.8, №5. - С.18-21
3. Владимиров Ю.А., Аричков А.П. Перекисное окисление липидов в биологической мембране // Терап. арх. - 1999. - №6. - С. 62-65.
4. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Порохов П.Г. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения // Вопр. мед. химии. - 1995. - Т. 41, №1. - С. 24-26.
5. Кендзерська Т.Б. Христин Т.М. Апоптоз у патогенезі хронічного панкреатиту у пацієнтів похилого віку з суттєвою ішемічною хворобою серця // Сучасна гастроентерологія. - 2002. № 3. - С.88-91

6. Кендзерська Т.Б. Шляхи корекції метаболічних змін та порушень системи гемостазу у хворих похилого віку на хронічний панкреатит із суттєвою ішемічною хворобою серця. Дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук. - 2002. - 234с.

7. Мецишен І.Ф., Петрова П.В. Окисление и восстановление в организмах крыс при введении этония // Укр. биохим. журн. - 1983. - №4. - С. 571 – 573.

8. Мецишен І.Ф. Метод визначення окислювальної модифікації білків (сироватки) крові // Бук. мед. вісник. - 1998. - Т. 2, №1. - С. 156-158.

9. Мецишен І.Ф. Глутатионова система організму за умов норми та патологій: Актова промова. - Чернівці: Мед академія, 1999. - 26 с.

10. Минухин О.Н., Масловский А.В. Болезни поджелудочной железы. Этиологические аспекты терапии хронических панкреатитов // - Consilium medicum. - 2005. - Т.7, № 6. - С. 8

11. Передедий В.Г., Ткач С.М., Кожевников А.Н., Клярская П.А., Передедий О.В. Апоптоз и заболевания желудочно-кишечного тракта // Сучасна гастроентерологія. - 2001. - № 1 ((3)). - С. 5-8.

12. Христин Т.Н., Пишак В.П., Кендзерська Т.Б. Хронічний панкреатит: нерешенні проблеми. - Черновці. - Медуніверситет. - 2006. - 279с.

Хронічний панкреатит у осіб похилого віку: про участь деяких ланок патогенезу у перебігу захворювання

Т.М. Христин

Автор, використовуючи дані літературні та власного клінічного спостереження (82 хворих) розкриває роль пероксидації ліпідів (ПОЛ), окислювальної модифікації білків (ОМБ), окислювального стресу, глутатионової ланки антиоксидантного захисту, TNF- α , CD95 у патогенезі особливостей перебігу хронічного панкреатиту (ХП) у осіб похилого віку.

Ключові слова: хронічний панкреатит, вік, цитокини, пероксидація ліпідів, гемостаз.

Chronic pancreatitis in elderly patients: some of mechanism of disease's development.

Т.М. Khristich

In article author tries to describe the role of activity of peroxide oxidation of lipids, oxidative modification of proteins, oxidative stress, tumor necrosis factor, CD95 in development of chronic pancreatitis in elderly patients.

Key words: chronic pancreatitis, elderly patients, cytokines, peroxide lipid oxidation, hemostasis.