

АПОПТОЗ У ПАТОГЕНЕЗІ ХРОНІЧНОГО ПАНКРЕАТИТУ У ПАЦІЄНТІВ ПОХИЛОГО ВІКУ З СУПУТНЬОЮ ІШЕМІЧНОЮ ХВОРОБОЮ СЕРЦЯ

Кендзерська Т.Б., Христич Т.М.

Буковинська державна медична академія, м. Чернівці

Ключові слова: хронічний панкреатит, оксидантна-антиоксидантна система, протеоліз, апоптоз, пацієнти похилого віку.

На сьогодні проблема розуміння патогенезу хронічного панкреатиту (ХП) не вирішена й актуальна.

Роль апоптозу при захворюваннях підшлункової залози (ПЗ) стала вивчатися нещодавно. Апоптоз — наслідок генетично детермінованої програми, спрямованої на загибель клітин [19, 20]. Виходячи з сучасних уявлень про те, що атрофія — це процес апоптозу, атрофія ПЗ у тварин при обструкції її протоки, використанні дієти з низьким вмістом міді, годуванні етіоніном асоціюється саме з апоптозом. Це підтверджує той факт, що апоптоз відіграє важливу роль у загибелі ацинарної тканини, що спостерігають при ХП [8, 17]. Індукторами або ефектами апоптозу можуть бути оксидантний стрес, активація протеаз, дисрегуляція обміну кальцію [1, 7]. Необхідною умовою функціонування клітини є підтримання нормального рівня процесів вільнорадикального окислення. При взаємодії вільних радикалів з мембранами клітин в них збільшується вміст гідроперексидів ліпідів. Поряд з пошкодженням ліпідного шару відбувається модифікація мембранних білків з утворенням додаткових жорстких зв'язків між різноманітними локусами протеїнової ниті (внаслідок незворотної взаємодії вторинних продуктів вільнорадикального окислення ліпідів з аміногрупами амінокислот) та змінами кінетичних властивостей білкових молекул.

Загострення ХП супроводжується активацією протеолітичної системи, діяльність якої тісно пов'язана з багатьма метаболічними функціями: підтримання гомеостазу, реакції фібринолізу, кініногенезу, системи імунітету [3]. Маючи високу активність, протеїнази за надмірної активації потенційно загрожують різноманітним білковим утворенням організму, тому потребують найретельнішого контролю [3].

У хворих похилого віку у виникненні та прогресуванні ХП провідну роль відіграє порушення кровообігу в ПЗ внаслідок атеросклеротичного ураження судин, які забезпечують її кровопостачання. Атеросклеротичне пошкодження (бляшки) — це наслідок прогресуючого хронічного запалення та проліферації клітин, що виникає у відповідь на різні пошкодження судинної стінки. Подібність клітинної популяції атеросклеротичних бляшок та вогнищ імунного запалення при різних захворюваннях свідчить, що атерогенез є хронічною запальною реакцією [9, 11]. Серед можливих антигенів особлива увага приділяється модифікованим ліпопротеїдам (ЛП) низької щільності (МЛПНЩ). Причому, значну роль

відіграє не стільки підвищена концентрація ЛПНЩ, скільки питома вага модифікованих ЛП. Модифікація ЛПНЩ найчастіше відбувається внаслідок протеолізу білкової частини ЛП, хімічної модифікації (у тому числі окислення) ліпідів та білків, агрегації ліпопротеїнових часточок або утворення імунних комплексів. Модифіковані ЛПНЩ спричиняють не тільки пошкодження гладком'язових клітин внутрішньої оболонки судин, а й стимулюють продукцію цитокінів, які відіграють провідну роль у формуванні структурного каркасу атеросклеротичної бляшки. Крім того, прозапальні цитокіни запускають процес запрограмованої смерті гладком'язових клітин, зумовлюють виснаження клітин, що продукують міжклітинний матрикс. Ймовірно, апоптозу належить певна роль у патогенезі атеросклерозу, оскільки атеросклеротичні зміни в судинах починаються з неконтрольованої проліферації гладком'язових клітин [18]. Такий процес пов'язаний з порушенням програми смерті клітин. Чутливість клітин до апоптозу залежить від рівня внутрішньоклітинних антиоксидантів [14-16]. Ми зробили спробу розглянути деякі ланки механізму прогресування запалення в паренхімі ПЗ на фоні атеросклеротичного ураження судин.

Доцільним було б вивчення апоптотичної активності, активності вільнорадикального окислення білків та ліпідів, протеолітичної активності крові, стану антиоксидантної системи захисту у пацієнтів похилого віку з ХП в поєднанні з ішемічною хворобою серця (ІХС).

Мета та завдання: визначити роль стану оксидантної-антиоксидантної системи, апоптотичної, протеолітичної та фібринолітичної активності (ФА) крові в патогенезі ХП, що може бути використано як додаткові діагностичні критерії та для оцінки ефективності медикаментозної корекції.

Матеріали та методи дослідження

Обстежено 42 пацієнти з ХП та ІХС: стенокардія напруги I-II функціонального класу (ФК), серцева недостатність (СН) I стадії за систолічним типом I-II ФК (за критеріями Нью-Йоркської асоціації кардіологів) віком від 50 до 75 років та 15 практично здорових осіб відповідного віку. Верифікацію діагнозу ІХС здійснювали за клінічними критеріями (аналіз вираженості больового синдрому, характер провокуючих його чинників, ефективність нітрогліцерину), даними електрокардіографії, велоергометрії, ехокардіографії, рентгенологічного

дослідження, холтерівського моніторингу. Екзокринну функцію ПЗ оцінювали за загальноприйнятою методикою (стимуляцію проводили хлористоводневою кислотою та маслиною олією). Основні судини, що кровопостачають ПЗ, та стан паренхіми органа досліджували з використанням ультразвукового доплерографічного методу за допомогою апарата «Ultramark-9». Критерієм ХП були нерівність контурів, зниження ехосигналів, збільшення органа (особливо головки), наявність вогнищ фіброзу. Поряд з клінічним обстеженням хворих використовували сучасні методи дослідження: кров для біохімічного аналізу брали ранком натще з ліктьової вени, використовуючи як стабілізатори гепарин та цитрат. Вміст продуктів вільнорадикального окислення ліпідів визначали за методом Т.А.Волчагорського та співавторів (1989); вміст малонового діальдегіду (МДА) — за Ю.А.Владимировим, А.І.Арчаковим (1972); вміст в крові відновленого глутатіону (ВГ) — за О.В.Травіною (1955) в модифікації І.Ф.Мещишена, І.В.Петрової (1983); сумарну ФА (СФА), неферментну ФА (НФА), ферментну ФА (ФФА) — за лізисом азофібрину; протеолітичну активність — за лізисом азоальбуміну, азоказеїну, азоколу («Simko Ltd», Україна). Інтенсивність окислювальної модифікації білків (ОМБ) визначали за методом О.Є. Дубініної та співавторів (1995) у модифікації І.Ф.Мещишена (1998). Готовність організму до апоптозу визначали шляхом імунофлуоресцентного забарвлення лімфоцитів периферичної крові з використанням моноклональних антитіл CD95 (Fas/APO-1) та FITC-позначених мишачих антитіл, оцінюючи відсоток клітин, що флуоресціюють.

Статистичний аналіз проведений з використанням методів варіаційної статистики за допомогою програми «Excel 2000».

Результати та їх обговорення

При дослідженні електрофорезу ліпідів співвідношення ЛП фракцій було зрушене на користь атерогенних ЛП (підвищення рівня β - та пре- β -ЛП, тригліцеридів).

Спостерігали підвищення інтенсивності перекисного окислення ліпідів (ПОЛ). Вміст МДА як без ініціації, так і з ініціацією НАДФН₂ аскорбатом був вірогідно більш високим ($p < 0,05$), ніж у здорових, що свідчило про значну патогенетичну роль ПОЛ у виникненні ХП [10]. Так, вміст МДА у хворих становив: без ініціації — $(8,72 \pm 0,18)$ мкмоль/л, у здорових — $(5,75 \pm 0,23)$ мкмоль/л, ($P < 0,05$), з ініціацією НАДФН₂ — $(11,02 \pm 0,36)$ мкмоль/л, у здорових — $(9,38 \pm 0,29)$ мкмоль/л, ($P < 0,05$). Підвищення рівня МДА корелювало з тяжкістю перебігу захворювання, що дає можливість вважати цей параметр маркером запальної активності. Крім того, процеси ПОЛ діють цитотоксично та стимулюють синтез колагену. За даними деяких авторів [2, 9], маркери функціонального стану нейтрофільних гранулоцитів крові — показники ПОЛ, а саме рівень МДА. При тому, що нейтрофільні гранулоцити мало представлені в атеросклеротичних бляшках, в крові вони — найактивніші учасники метаболізму ЛПНЩ. Їх функціональний стан визначається активністю атеросклеротичного процесу та відображає цю активність.

При вивченні стану пероксидного окислення білків спостерігали підвищення рівня нейтральних альдегідо-

та кетоніальних до $(2,35 \pm 0,11)$ ммоль/г білка, у здорових — $(1,73 \pm 0,08)$ ммоль/г білка ($P < 0,05$), рівень основних альдегідо- та кетоніальних практично не змінювався. ОМБ більш чутливі до протеолізу, оскільки фрагментовані й денатуровані білки є субстратом для внутрішньоклітинних протеаз. Накопичення ОМБ є складовою багатьох чинників, які керують як синтезом і окисленням білків, з одного боку, так і активністю різних протеаз, з іншого, та може бути раннім критерієм пошкодження тканин активними формами кисню [5].

Відкладені в стінці судини модифіковані ЛПНЩ є актиантами для прозапальних клітин і стимулюють виділення специфічних медіаторів запалення, що підвищують апоптотичну чутливість клітин. В свою чергу, медіатори запалення підвищують зв'язування ЛПНЩ з ендотелієм та гладком'язовими клітинами, посилюючи транскрипцію гена-рецептора ЛПНЩ [9, 11]. За рахунок ключових ланок — факторів хемотаксису локальне пошкодження стінки артерій та ПЗ зумовлює генералізацію процесів, виникнення поліорганної недостатності.

У хворих спостерігали зниження ФА плазми (тенденція до зниження СФА, значне зниження ФФА, підвищення НФА), що може сприяти утворенню мікротромбів. Накопичення фібриногену (фібринові утворення в тканинах внаслідок транссудації білків з плазми через підвищену проникність капілярів) та продуктів його деградації у поєднанні з пригніченням ФА (депресія ФФА — фактор, що сприяє відкладенню фібрину) — це основа формування фіброзу [4]. Вірогідне ($P < 0,05$) підвищення НФА свідчить про мобілізацію лаброцитів, які вивільняють гепарин, що сприяє активації гормоно-гепаринових комплексів. Підвищення НФА також пов'язане з літогенезом на рівні жовчного міхура та нирок (пригнічення фібринолізу зумовлює утворення глікопротеїдного міцелярного гелю — комплексу сферо-, мікро- та макролітів внаслідок зниження в жовчі вмісту таурохолевої кислоти, яка є потужним активатором плазміногену) [6]. Можна припустити виникнення обструкції проток ПЗ за подібним механізмом та значну роль у прогресуванні захворювання підвищення тиску в жовчних протоках (наявність біліопанкреатичного рефлюксу).

Спостерігали активацію плазматичного протеолізу: підвищення лізису низькомолекулярних білків та інтенсифікацію протеолітичної деградації високомолекулярних білків. При дослідженні активності колагенази виявлені різноспрямовані зміни. Хворі розподілилися на дві групи: у 15 з них вона становила $(0,48 \pm 0,05)$ мл/год, у здорових — $(0,84 \pm 0,04)$ мл/год ($P < 0,05$); у 27 — $(1,98 \pm 0,05)$ мл/год, у здорових — $(0,84 \pm 0,04)$ мл/год ($P < 0,05$). При клінічному співставленні виявлено, що у хворих з легким перебігом ОП спостерігали зниження активності колагенази, що свідчило про збільшення синтезу колагенових волокон, виникнення фіброзу та склерозу. У хворих з ХП середньої тяжкості та тяжким спостерігали підвищення активності колагенази, що свідчило про переважання процесів деструкції тканини ПЗ над фіброзом та склерозом. Отже, відбувається активація протеолізу з максимальним підвищенням інтенсивності протеолітичної деградації високомолекулярних білків до $(4,55 \pm 0,18)$ мл/год, у здорових — $(1,93 \pm 0,11)$ мл/год ($P < 0,05$). Це можливо за рахунок кількох механізмів: накопичення ОМБ, продуктів ПОЛ; підвищення активності протеаз (порушення ациносів з фено-

меном «ухилення» ферментів ПЗ, дегрануляції нейтрофілів гранулоцитів, генетичне порушення структури протеаз трипсинозного типу); зниження активності інгібіторів протеаз (генетично запрограмованого порушення синтезу альфа-1-антитрипсину, порушення синтетичної функції печінки при поєднанні з захворюваннями гепатобіліарної системи; дисфункція ендотелію у пацієнтів похилого віку). Зазначені зміни також можуть спричиняти підвищення апоптотичної активності, яку ми визначали при дослідженні рівня CD95. Таким чином можна пояснити атрофію ацинусів при поєднанні з підвищеною проліферацією клітин сполучної тканини і, як наслідок, виникнення фіброзу та склерозу ПЗ.

Активация вільнорадикального окислення у хворих супроводжувалася порушенням функціонування однієї з основних антирадикальних систем організму — системи глутатіону, що є основним джерелом відновних еквівалентів для регуляції окисного статусу в клітині. Про це свідчило достовірне ($P < 0,05$) зменшення вмісту ВГ — до $(2,13 \pm 0,05)$ мкмоль НАДФН₂ за 1 хв. на 1 г гемоглобіну (Hb), у практично здорових — $(2,75 \pm 0,06)$ мкмоль НАДФН₂ за 1 хв. на 1 г Hb. Оскільки ВГ, на думку деяких авторів [12, 13, 16], є інгібітором апоптозу, зниження рівня його при значному підвищенні інтенсивності перекисного окислення білків, ліпідів, активації протеолітичної системи може свідчити про значну роль апоптозу у виникненні та прогресуванні захворювання.

При дослідженні апоптотичної активності спостерігали підвищення поверхневої експресії CD95 на лімфоцитах крові у хворих на ХП з супутньою ІХС до $(2,03 \pm 0,24)\%$, у практично здорових — $(0,96 \pm 0,23)\%$ ($P < 0,005$). Отримані дані свідчать про підвищення апоптотичної актив-

ності клітин ПЗ. Наявність холестерину при ХП посилює апоптотичну активність клітин, оскільки токсичні гідрофобні жовчні кислоти включають ліганд-незалежну стимуляцію Fas-рецептора, активацію каскаду протеаз. Крім того, активізація апоптозу, можливо, є одним з механізмів імуносупресивної дії етанолу.

Поєднання хронічного місцевого запалення ПЗ (ХП) та генералізованого хронічного запалення судин (атеросклерозу) спричиняє значніші зміни гомеостазу, що зумовлює зміни у програмі загибелі клітин.

Висновки

1. Високий вміст у крові продуктів перекисного окислення ліпідів та білків, дестабілізація системи протеаз-антипротеаз та підвищення рівня атерогенних ліпідів у пацієнтів з ХП та супутньою ІХС зумовлює підвищення інтенсивності модифікації ЛПНЩ, пошкодження ацинарних клітин ПЗ. Це може стимулювати виникнення початкових етапів запалення шляхом активації цитокінового каскаду з наступним локальним пошкодженням та активацією апоптозу.

2. Дослідження змін в системі фібринолізу, протеолізу, перекисного окислення білків та ліпідів, вивчення апоптотичної активності можна використовувати як додатковий прогностичний показник активності хронічного запального процесу в ПЗ та тяжкості перебігу ХП у пацієнтів похилого віку, для призначення адекватного медикаментозного лікування.

3. Питання, чим є окисний стрес та активація протеаз — наслідком чи індуктором функціональних змін, що супроводжують запрограмовану загибель клітини, залишається відкритим.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Аруин Л.И. Апоптоз и патология печени // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. — 1998. — № 2. — С. 8-12.
2. Афонина Г.Б., Русин Е.В., Брюзгина Т.С. Изучение антиоксидантной устойчивости иммунокомпетентных клеток // Клини. лаб. диагностика. — 1998. — №6. — С.35-37.
3. Веремеенко К. Н. Протеолитические ферменты и их ингибиторы. Новые области применения в клинике // Врачеб. дело. — 1994. — № 1. — С. 8-13.
4. Кухарчук О.Л., Кузнецова О.В. Вплив спленектомії на обмежений і необмежений протеоліз у плазмі крові і тканинах внутрішніх органів білих щурів // Вісн. наук. досліджень. — 2001. — №1. — С. 96-98.
5. Мешишен І.Ф., Польовий В.П. Механізм окислювальної модифікації білків // Буковин. мед. вісн. — 1999. — №1-2, С. 199-203.
6. Мильков Б.О., Кухарчук О.Л., Домбровський Д.Б., Гумінецький С.Г. Роль порушення фермента-тивного фібринолізу при білірулії // Буковин. мед. вісн. — 1999. — №3-4. — С.25-27.
7. Певницкий Л. А. Программированная гибель клеток и апоптоз: значение для развития и функционирования иммунной системы // Вестн. РАМН. — 1996. — № 6. — С. 43-50.
8. Передерий В.Г., Ткач С.М., Кожевников А.Н., Клярская И.Л. и др. Апоптоз и заболевания желудочно-кишечного тракта // Сучасна гастроентерологія. — 2001. — №1. — С. 5-8.
9. Титов В.Н. Общность атеросклероза и воспаления: специфичность атеросклероза как воспалительного процесса // Рус. мед. журн. — 1999. — № 5. — С. 4-8.
10. Христич Т.М., Мельничук З.А. Интенсивность перекисного окисления липидов, активность глутатионовой системы при хроническом панкреатите у хворих похилого віку // Пробл. экологии та медицини. — 1999. — № 5. — С. 21-22.
11. Яблучанский Н.И. Атеросклероз больше чем воспаление // Medicus Amicus. — 2002. — №1. — С. 1-4.
12. Bonkhof T.H., Fixemer T., Hunsicker I. et al. Simultaneous detection of DNA fragmentation (apoptosis), cell proliferation (MIB-1), and phenotype markers in routinely processed tissue sections // Virch. Arch. — 1999. — Vol. 434. — P. 71-73.
13. Degli E. M. Apoptosis: who was first // Cell Death Diff. — 1998. — Vol. 5. — P. 719.
14. Faubion W. A., Gores G. J. Death receptors in liver biology and pathobiology // Hepatology. — 1999. — Vol. 29. — P. 1-4.
15. Frisch S. M., Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis // J. cell biol. — 1994. — Vol. 124. — P. 619-626.
16. Hockenbery D. Defining apoptosis // Amer. J. pathol. — 1995. — Vol. 146. — P. 16-19.
17. Jacobson M., Wail M., Raff M. Programmed cell death in animal development. — 1997. — Vol. 88. — P. 347-354.
18. James T. N. Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart. From postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias // Circulation. — 1994. — Vol. 90. — P. 556-573.
19. Kerr J. F. R., Wyllie A. H., Currie A. R. Apoptosis; a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics // Brit. J. Cancer. — 1972. — Vol. 26. — P. 239-257.
20. Magno G., Joris I. Apoptosis, oncosias, necrosis // Amer. J. Pathol. — 1995. — Vol. 146. — P. 3-15.

АПОПТОЗ В ПАТОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКОГО ПАНКРЕАТИТА У ПАЦИЕНТОВ ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА С СОПУТСТВУЮЩЕЙ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

Кендзерская Т.Б., Христич Т.М.

Проблема понимания патогенеза хронического панкреатита не решена и актуальна. Исследование изменений в системе фибринолиза, протеолиза, перекисного окисления белков и липидов, изучение апоптотической активности может быть использовано в качестве дополнительного прогностического критерия активности хронического воспалительного процесса в поджелудочной железе и дает возможность прогнозировать тяжесть течения хронического панкреатита у пациентов пожилого возраста для назначения адекватного медикаментозного лечения.

APOPTOSIS IN PATHOGENESIS OF CHRONIC PANCREATITIS OF OLD PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE

Kendzerska T.B., Christich T.M.

The problem of understanding of chronic pancreatitis pathogenesis is quite actual. Researching the dynamics of proteolysis, fibrinolysis system, peroxydation of lipids and proteins as well as apoptotic activity of the blood can be considered as a base for indication of pathological process activity and for substantiation of differential treatment of the given group of patients.