

ПАТОФИЗИОЛОГИЯ ГОРМОНАЛЬНЫХ, ИММУННЫХ, МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ПРИ ОСТРОМ И ХРОНИЧЕСКОМ ПАНКРЕАТИТЕ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Трубицына И. Е., Чикунова Б. З., Ткаченко Е. В., Царегородцева Т. М., Винокурова Л. В., Варванина Г. Г.

Центральный научно-исследовательский институт гастроэнтерологии, Москва

РЕЗЮМЕ

В статье дан обзор литературных данных об экспериментальном моделировании острого и хронического панкреатита. Экспериментальные исследования позволили выявить патогенетические механизмы некроза с последующим развитием фиброза ткани поджелудочной железы. Данные о стимуляции синтеза и секреции протеолитических ферментов, полученные в экспериментальных условиях, сопоставлены с клиническими исследованиями, которые были проведены у больных хроническим панкреатитом в ЦНИИ гастроэнтерологии.

Ключевые слова: поджелудочная железа, панкреатит, протеазы, цитокины, холецистокинин, секретин, серотонин, ацетилхолин, секреция, синтез протеаз, модели панкреатита.

SUMMARY

There is literature review of the acute and chronic pancreatitis experimental models. Patogenetic necrosis mechanisms with fibrosis progress in pancreas were revealed. The stimulation of the proteolytic enzymes synthesis and secretion, that was examined in experiments were compared with clinical examinations. The patients with chronic pancreatitis were investigated in the Central Research Institute of Gastroenterology.

Key words: pancreas, cholecystokinin, secretin, serotonin, acetylcholine, secretion, protease synthesis, pancreatitis model.

Панкреатит — полиэтиологическое заболевание, которое развивается по своим внутренним законам, подчиняясь общим и местным сигналам медиаторов, принимающих участие в динамике развития и поддержания воспаления ткани поджелудочной железы (ПЖ). Механизм возникновения деструктивных процессов в ПЖ неясен до сих пор.

Функционально-анатомической единицей ПЖ является ациноцит (ацинарная клетка). Они составляют от 70 до 90% клеточной массы ПЖ, собраны в альвеолярные образования разнообразной формы (ацинусы), состоящие из 20–50 ацинарных клеток. Ацинусы связаны между собой протоковой системой ПЖ. Ациноциты синтезируют и секретируют в полость протоков белковый секрет, состоящий на 98%

из ферментов: трипсина, химотрипсина, эластазы, коллагеназы, липазы, обладающих протео- и липолитической активностью. В ацинарных клетках и протоках ПЖ протеазы находятся в неактивной форме (трипсиноген, химотрипсиноген, проэластаза), и только после поступления панкреатического сока в просвет двенадцатиперстной кишки под влиянием энтерокиназ, цитокиназ кишечного сока и трипсина они переходят в активную форму. Из всего комплекса протеолитических ферментов особое положение занимает трипсин, который способен активировать сам себя и другие протеолитические ферменты, в том числе фосфолипазу. Секрет в протоках ПЖ содержит электролиты и бикарбонаты, его рН = 7,5–8,8. Максимум активности протеаз отме-

чен при $pH = 7,0-8,0$. Часть ферментов может быть активирована в зоне $pH = 4,5-6,0$ при сохранении протеолитической активности [2].

Ткань ПЖ защищена от самопереваривания тем, что протеолитические ферменты синтезируются в неактивной форме. В клетке они находятся в зимогенных гранулах и, кроме того, протеолитические ферменты прочно связаны с ингибиторами. В просвет протоков они поступают в неактивной форме. Но любое препятствие продвижения секрета (анатомическое сужение протоков, гипертония, потеря «текучести» секрета ПЖ, наличие физического препятствия — камни, опухоль) может быть причиной внутрипротоковой активации протеолитических ферментов и аутолиза ткани ПЖ.

Проведен анализ предлагаемых экспериментальных моделей воспроизведения острого и/или хронического панкреатита (ХП) у животных. Деструктивные процессы в поджелудочной железе развивались в 100% экспериментальных исследований, но интенсивность воспалительного процесса была разной [5].

Огромное количество экспериментальных исследований посвящено моделированию острого и/или хронического панкреатита при нарушении оттока панкреатического сока или при ретроградном введении разнообразных растворов, чем моделируется состояние, когда возникает обратный заброс (рефлюкс) панкреатического сока. В проток вводили растворы: 3,5–5%-ный таурохолата натрия, желчных кислот, содержимого двенадцатиперстной кишки, активных ферментов (эластазы, трипсина), которые были взяты у животных или у больных панкреатитом и введены экспериментальным животным. Поросятам или морским свинкам вводили в проток активные ферменты здоровых людей, через 3 часа у животных развивался острый панкреатит [6, 7].

Можно заключить, что наличие активных ферментов в протоках или внутрипротоковая активация протеаз является этиологическим фактором некроза ткани ПЖ и развития острого панкреатита.

Воспроизведение хронического панкреатита было возможным при многократном ретроградном введении растворов (3,5–5%-ный таурохолата натрия, желчных кислот, содержимого двенадцатиперстной кишки, активных ферментов). Подобное моделирование требовало катетеризации протока и выведения дистального конца катетера на шею животного для инъекций. Ежедневно в течение 3–5 дней проводили введение раствора. В результате проводимых манипуляций локально развивался острый панкреатит с переходом в хронический [3].

Лигирование общего протока на 3 часа приводило к образованию острого панкреатита. Если нарушение оттока секрета ПЖ сочеталось с повышением секреции, некроз ткани был обширным, а введение ингибиторов протеолитических ферментов не предотвращало образования повреждений [1].

Таким образом, нарушение оттока или рефлюкс кишечного содержимого может быть причиной острого панкреатита, а если одновременно происходит нарушение секреторной активности, деструкция (некротическая) ткани ПЖ обширная.

Далее рассмотрены экспериментальные модели панкреатита при нарушении секреторной активности ПЖ.

Экспериментальные исследования по воспроизведению острого и/или хронического панкреатита, в основе которых находятся секреторные нарушения, требуют знания нормальной физиологии ПЖ. Используя здоровых животных, изучали экскреторную функцию поджелудочной железы, которая возрастала многократно при введении холецистокинина, церулина, ацетилхолина, при закислении или ошелачивании дуоденального содержимого, применении различных видов пищи. Необходимо помнить, что секреторная активность поджелудочной железы зависит от массы тела животного и дозы вводимого препарата [4, 11]. Секретируя протеолитические ферменты, обладающие мощной протео- и липолитической активностью, ПЖ чувствительна к любым механическим, химическим, секреторным воздействиям. В результате этих стимулов может произойти внутритканевая активация проферментов, что приведет к некрозу ткани. Аутоактивация протеолитических ферментов происходит, но механизм этого процесса неясен.

Изоферментный спектр протеолитических ферментов генетически детерминирован. Большое число работ посвящено выявлению изоформ протеаз (амилазы, эластазы, липазы), которые обладают свойствами аутоактивации внутри клетки. Выведена линия мышей — *ubr1^{-/-}*, имеющих дефект гена, отвечающего за синтез эластазы, в результате этого повышено содержание изоформы фермента, которая обладает высокой протеолитической активностью и способна к спонтанной внутриклеточной активации. Однократное введение церулина или холецистокинина (ХЦК) провоцирует клеточный аутолиз. Контрольным животным, для того чтобы вызвать внутриклеточную активацию проферментов, необходимо многократное введение ХЦК или церулина [17].

Процесс деструктивного действия протеаз после стимуляции экзокринной секреции ПЖ зафиксирован и продемонстрирован на электронограммах. На них видно, что активный синтез проферментов, то есть увеличение числа гранул, приводит к слипанию зимогенных гранул, в результате чего блокируется выход их за пределы ацинарной клетки и все завершается повреждением проницаемости мембран зимогенных гранул, аутоактивацией протеаз и деструкцией клетки. В эксперименте у обычных интактных крыс аутоактивация протеаз

наблюдается при длительном введении субмаксимальных доз холецистокинина или церулина. Но механизм действия идентичен тому, который выявлен у мышей линии *ubr1^{-/-}*. Блокируется выход протеаз из клетки, что приводит к гибели клетки и развитию фиброза [16, 17]. Кроме длительного введения холецистокинина или церулина, панкреатит в эксперименте можно воспроизводить введением прозерина, который вызывает эндогенное повышение ацетилхолина. Ацетилхолин стимулирует выделение субстанции P и хемокинов, которые через клеточные медиаторы стимулирует секрецию фосфолипазы C, инициируя локальный некроз ацинарных клеток [8].

Анализируя литературные данные по экспериментальному моделированию, мы решили, что будет интересно представить собственные наблюдения о содержании ХЦК, секретина, ацетилхолина и серотонина в сыворотке крови больных хроническим панкреатитом.

СОБСТВЕННЫЕ ДАННЫЕ

В клинике ЦНИИ гастроэнтерологии было проведено исследование по определению концентрации стимуляторов секреторной активности ПЖ. У 67 больных хроническим панкреатитом алкогольной этиологии и 15 здоровых лиц в сыворотке крови определяли содержание ацетилхолина (Ах), серотонина (5-НТ), секретина (С), холецистокинина (ХЦК). Уровень содержания гормонов секретина и холецистокинина сопоставлен с концентрацией нейромедиаторов.

В сыворотке крови больных ХП повышено содержание 5-НТ — $0,39 \pm 0,05$ мкг/мл ($p < 0,01$) и Ах — $1,8 \pm 0,14$ ммоль/мл ($p < 0,05$), здоровые — $0,19 \pm 0,02$ мкг/мл и $0,8 \pm 0,019$ ммоль/мл соответственно, ХЦК — $0,94 \pm 0,012$ пг/мл ($p < 0,05$), С — $0,35 \pm 0,021$ пг/мл ($p < 0,05$), здоровые — $0,58 \pm 0,01$ и $0,96 \pm 0,02$ пг/мл соответственно.

У больных ХП выявлено одновременное повышение нескольких стимуляторов секреторной актив-

ности ПЖ, которые стимулируют синтез и секрецию протеаз, снижен уровень содержания секретина, который стимулирует секрецию воды и гидрокарбонатов, что является причиной увеличения вязкости и снижения pH секрета ПЖ. Это может быть причиной внутриклеточной и внутрипротоковой активации протеаз.

Выявленные нарушения в системе регуляции убедительно демонстрируют, что обострение ХП происходит при повышении содержания стимуляторов (Ах, 5-НТ, ХЦК) в крови.

Таким образом, поджелудочная железа имеет сложную многокомпонентную нейроиммуногормональную систему регуляции секреторной активности, которая имеет прямую и обратную зависимость от структурного состояния ткани ПЖ. А как представлено в экспериментальных исследованиях (см. выше), повышенное содержание ХЦК, Ах может вызывать некроз ацинарных клеток и развитие фиброза [10, 12, 14].

Механическое травмирование ткани поджелудочной железы, как само, так и при дополнительном введении прозерина в дозе 0,06 мг/кг, вызывает образование острого панкреатита [8]. В результате этих манипуляций происходят гибель липосом, локальное высвобождение липазы, которая оказывает цитотоксическое действие и является инициатором острого панкреатита, развивающегося через 24 часа. Внутритканевая активация проферментов заканчивается развитием острого панкреатита, но необходимо помнить, что проферменты имеют крепкую связь с ингибиторами. Поэтому нарушение синтеза ингибитора трипсина (PSTI) в ацинарных клетках — ген SPINK-1 — может приводить к поступлению активных ферментов в протоки ПЖ. PSTI секретируется в протоки вместе с протеазами, но его ингибирующая способность не всегда может инактивировать протеазы, так как он ингибирует только около 20% внутриклеточно активированного трипсина. У части больных хроническим панкреатитом выявлены изменения в гене SPINK-1, что повышает риск возникновения острого панкреатита у этой группы людей [16].

Метаболические нарушения ткани ПЖ могут быть пусковым механизмом образования острого панкреатита и фиброза. Об этом свидетельствуют исследования, проведенные на клеточном уровне. Исследования *in vitro*: мембранные повреждения митохондрий приводят к выходу в цитоплазму белка AIF (Apoptosis Inducing Factor) и цитохрома C, которые активируют каспазный каскад, в обычных условиях участвующий в процессе апоптоза, но в данном случае, когда это происходит в ациноците, «богатом» протеазами, гибель клетки идет по некротическому, «анархическому» пути. Стабилизация митохондриальных мембран предупреждает развитие необратимых повреждений [9].

Гомеостаз ткани во многом зависит от кровотока в железе. Снижение числа функционирующих капил-

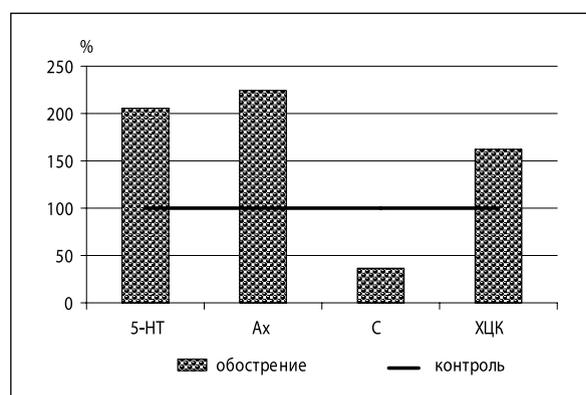


Рис. 1. Содержание серотонина, ацетилхолина, секретина, холецистокинина в сыворотке крови больных хроническим панкреатитом.

**СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ (ПГ/МЛ), 5-НТ (МКГ/МЛ), АХ (ММОЛЬ/Л) В СЫВОРОТКЕ КРОВИ
У БОЛЬНЫХ ХП**

	IL-1 β	IL-6	IL-8	TNF- α	IF γ	IL-4	5НТ	Ах
Обост- рение	1454 \pm 290**	122 \pm 25**	1176 \pm 198**	833 \pm 132**	213 \pm 38**	407 \pm 79**	0,33 \pm 0,03*	1,2 \pm 0,2*
Ремис- сия	320 \pm 58**	33 \pm 6*	125 \pm 21**	22 \pm 4	214 \pm 35**	36 \pm 6,8	0,39 \pm 0,05*	1,8 \pm 0,25*
Конт- роль	37 \pm 7	7 \pm 0,9	40 \pm 7,5	44 \pm 8,7	39 \pm 7	40 \pm 7,9	0,19 \pm 0,02	0,8 \pm 0,01

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

ляров или внезапное прекращение кровотока приводит к кислородному голоданию и закислению ткани до pH 4,5, при котором происходит активация проферментов и «запускается анархический» апоптоз клеток, то есть в ПЖ образуются очаги некроза. Предварительное введение грелина предотвращает микроциркуляторные нарушения и гибель клеток [10].

Кроме того, острый панкреатит возникает как при нарушении микроциркуляторного кровотока в самой железе, так и при заболеваниях, повреждающих свертывающую систему животных. Предварительное введение гепарина предупреждает образование острого панкреатита [15].

Воспроизведение острого панкреатита тем или иным способом создает очаг воспаления, куда устремляются медиаторы воспаления — NO, 5-НТ, провоспалительные цитокины (TNF α , IL-1 β , IFN γ). Они обладают цитотоксическим действием, нарушают кровоток, проницаемость мембран в паренхиме ПЖ [16]. При экспериментальном воспроизведении острого панкреатита у животных повышено содержание TNF α и IL-1 β , которые являются инициаторами иммунообусловленного воспаления в ткани [16].

У больных ХП, находящихся на стационарном лечении в клинике ЦНИИ гастроэнтерологии, определяли уровень содержания про- и противовоспалительных цитокинов. Мы смогли сопоставить экспериментальные и собственные данные, полученные у больных ХП, и выявить аналогичные изменения.

Как уже указывалось выше, в наших исследованиях выявлено повышение серотонина и ацетилхолина в сравнении с контрольным уровнем. Кроме того, у больных хроническим панкреатитом с выраженными фиброзными изменениями ткани ПЖ меняется «схема» регуляторных взаимоотношений, основным стимулятором становится 5-НТ. Снижается роль парасимпатического отдела вегетативной нервной системы как регулятора воспалительной реакции. Высокий уровень нейромедиаторов способствует длительному повышению провоспалительных цитокинов в период как обострения, так и ремиссии. Не происходит завершения воспалительной реакции в ткани ПЖ, одновременно могут быть выявлены очаги свежего некроза и явления хронического панкреатита (фиброз) (таблица, рис. 2).

В условиях хронического воспаления параринные эффекты цитокинов в его эпицентре могут провоцировать флогогенный эффект, а по его периферии — репаративный. В зависимости от характера сопутствующих условий одни и те же цитокины могут инициировать в качестве альтернативы процессы фиброза или тканевой регенерации, что имеет значение в отношении отдаленных последствий воспалительного процесса. Цитокины имеют тесный, многоплановый контакт с нейроэндокринной системой и интегрируются с ней в единую иммуно-

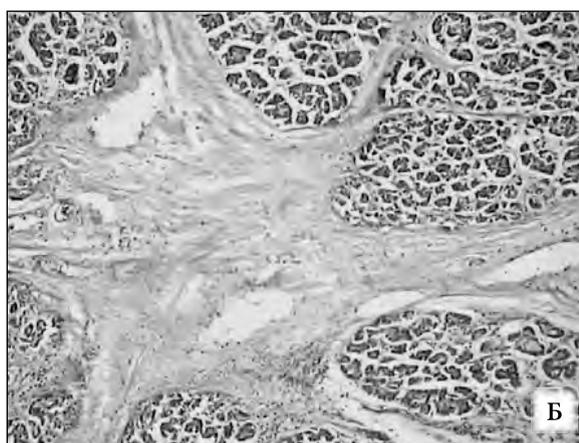
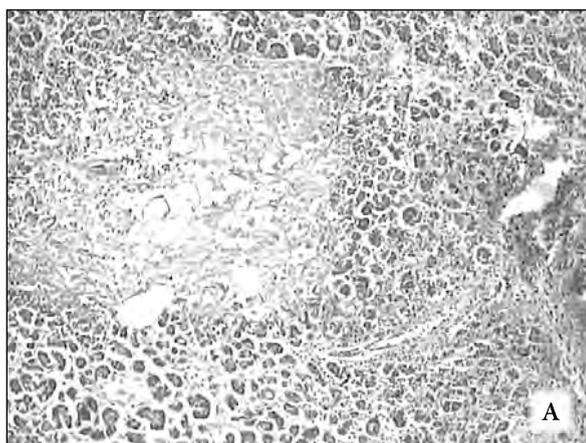


Рис. 2. Ткань поджелудочной железы с очагами свежего некроза (А) на фоне хронического панкреатита (Б). Окр. Г-Э, $\times 120$

нейроэндокринную систему. Влияние иммунцитов на нервную систему осуществляется не только через цитокины, но и через другие факторы, включающие большинство тропных гормонов гипофиза, эндорфины, некоторые другие гормоны и нейромедиаторы. Нарушение взаимного влияния и регуляторных взаимоотношений является неблагоприятным фактором, влияющим на пато- и саногенез как острых, так и хронических заболеваний. При хроническом панкреатите у больных выявлена дисрегуляция как секреторной активности ПЖ, так и внутриклеточного воспаления.

Далее представлена следующая группа экспериментального воспроизведения острого панкреатита с последующим переходом в хронический панкреатит: после лапаротомии на ткань поджелудочной железы воздействовали хлорэтилом, уксусной кислотой, холодом [1]. Через 1 час развивался острый панкреатит, а через 48 часов и более — хронический. Данные модели удобны тем, что можно изучать действие различных препаратов на пато- и саногенез панкреатита. Морфологическая картина идентична той, которая бывает у больных хроническим панкреатитом. О. Д. Черныярова, используя «ацетатную» модель воспроизведения хронического панкреатита, могла в динамике наблюдать изменения ингибиторов трипсина в сыворотке крови и ткани поджелудочной железы крыс. В острый период в крови снижался уровень содержания ингибитора трипсина, а содержание ферментов повышалось. Появление активных ферментов в паренхиме ПЖ может быть обусловлено лизосомными ферментами. В ткани ПЖ и сыворотке крови повышалось содержание катепсина В [1].

Все вышеперечисленные модели экспериментального панкреатита и клинические исследования

у больных продемонстрировали важную роль метаболических процессов в ткани поджелудочной железы. Но при изучении клеточного аутолиза необходимо соблюдать одно важное условие — отсутствие рефлюкса панкреатического сока с возможностью его попадания в интестинальное пространство и лимфатические капилляры.

Необходимо знать, что ферментный состав панкреатического сока, его объем и свойства адаптированы к количеству и качеству пищи и зависят от режима и характера питания. Регуляция секреции в основном осуществляется М-холинергическими и гормональными влияниями. Секретин стимулирует гидрокинетическую функцию ПЖ — выработку жидкой части панкреатического сока и бикарбонатов. Холецистокинином стимулированный сок богат ферментами и беден бикарбонатами. Голодание приводит к снижению объема панкреатического сока и концентрации в нем ферментов. Прием же пищи резко стимулирует функциональную активность ПЖ, выработку панкреатического сока, а количество крови, поступающей к поджелудочной железе, может увеличиваться в 25 раз [2].

Все эти особенности секреторной активности поджелудочной железы, свойств панкреатического сока необходимо учитывать при проведении инструментальных исследований и изменении диетического питания. Современные достижения в фармакологии при наличии материально-технического обеспечения благоприятно влияют на течение острого воспалительно-деструктивного процесса в ПЖ, но не всегда можно добиться благоприятных результатов лечения. Необходимо помнить, что панкреатит — тяжелое заболевание, имеющее непредсказуемое развитие патологического процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Логинов, А. С. Ингибиторы протеаз в поджелудочной железе и сыворотке крови: физиологическая роль / А. С. Логинов, Н. Ш. Б. Амиров, О. Д. Черныярова // Физиол. журн. СССР. — 1982. — Т. 68, № 5. — С. 692–698.
2. Коротыко, Г. Ф. Секретия поджелудочной железы / Г. Ф. Коротыко. — Краснодар, 2005. — 311 с.
3. Asaumi, H. The stimulatory effects of various extracellular matrix on rat pancreatic stellate cells / H. Asaumi, M. Taguchi et al. // Pancreatology. — 2008. — Vol. 8, № 3. — P. 299
4. Bonior, J. Does endotoxemia in the infant rats modulate apoptosis in the pancreatic acinar cells? / J. Bonior et al. // Pancreatology. — 2008. — Vol. 8, № 3. — P. 298.
5. De Dios, I. Chemokine production in acute pancreatitis induced by bile-pancreatic duct obstruction effect of N-acetylcystein / I. De Dios, L. Ramudo et al. // Pancreatology. — 2008. — Vol. 8, № 3. — P. 286.
6. Ewald, N. Enzyme release from cultured human pancreatic acini / N. Ewald, H. Jahr et al. // Pancreatology. — 2008. — Vol. 8, № 3. — P. 312.
7. Hiroto, Masahino. Autophagy activates trypsinogen within the pancreatic acinar cells and induces acute pancreatitis / Masahino Hiroto, M. Ohmuraya et al. // Pancreatology. — 2008. — Vol. 8, № 3. — P. 293.
8. Kosachenko, A. V. Effect of liposomal citotoxic in the initial phase of experimental acute pancreatitis / A. V. Kosachenko, L. N. Voronina // Pancreatology. — 2008. — Vol. 8, № 3. — P. 287.
9. Keel, M. Pancreatic stone protein/regenerating protein activates granulocytes and is highly increased in blood during post-traumatic sepsis / M. Keel et al. // Pancreatology. — 2008. — Vol. 8, № 3. — P. 308.
10. Kusnierz, P. The chendges in pancreatic microcirculatory perfusion following experimentally induced acute pancreatitis / P. Kusnierz et al. // Pancreatology. — 2008. — Vol. 8, № 3. — P. 290–291.
11. Malla, S. The role autophagy in acute pancreatitis — friend or foe? / S. Malla et al. // Pancreatology. — 2008. — Vol. 8, № 3. — P. 292.
12. Odinkova, I. V. Mitochondrial mechanisms of death responses of pancreatitis / I. V. Odinkova et al. // Pancreatology. — 2008. — Vol. 8, № 3. — P. 287–288.
13. Ramnath, R. Participation of phospholipase C in SP-induced chemokine production in hfycreatic acinar cells / R. Ramnath, J. Sun, et al. // Pancreatology. — 2008. — Vol. 8, № 3. — P. 288.
14. Strobel, O. Role and diagnostic potencial of HMGB 1, a marker of necrosis and pro-inflammatory mediator, in experimental acute pancreatitis / O. Strobel, D. Merz // Pancreatology. — 2008. — Vol. 8, № 3. — P. 290.
15. Yubero, S. Effect of immunomodulating treatments on necrotizing acute pancreatitis / S. Yubero, M. A. Manso et al. // Pancreatology. — Vol. 8, № 3. — P. 289.
16. Ulrich Weiss, F. Germline mutation and gene polymorphism associated with human pancreatitis / F. Ulrich Weiss, P. Simon et al. // Endocrinol. Mtab. Clin. N. Am. — 2006. — Vol. 35. — P. 289–302.
17. Zenker, M. Genetic basis and pancreatic biology of Johanson-Blizzard syndrom / M. Zenker, J. Mayerle et al. // Endocrinol. Mtab. Clin. N. Am. — 2006. — Vol. 35. — P. 243–253.
18. Venglovecz, V. Effect of bile acids on lon conductances in native pancreatic duct cells / V. Venglovecz, P. Yegyí et al. // Pancreatology. — 2008. — Vol. 8, № 3. — P. 289.