

ЛЕКЦИЯ

УДК 616.37-002:612.015
©В.В. Шабанов

ПУСКОВЫЕ МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ ТРИПСИНОГЕНА ПРИ ОСТРОМ ПАНКРЕАТИТЕ

В.В. Шабанов

Самарский военно-медицинский институт, 443099 Самара, Пионерская 22,
тел.: (8462) 39-92-71; факс: (8462) 37-11-22, 34-11-28; эл.почта: sjuris@rs34.ssau.ru

Рассмотрены ранние патогенетические события при остром панкреатите. Обсуждаются возможные механизмы внутриклеточной активации трипсиногена. Особое внимание уделено роли катепсина В, внутриацинарной концентрации ионов Ca^{2+} и генерации свободных радикалов кислорода в преждевременной активации зимогенов. Показано, что активация трипсиногена сама по себе не является достаточной для повреждения ацинарной клетки и в повреждении поджелудочной железы и развитии системных осложнений, ведущую роль играют другие факторы.

Ключевые слова: острый панкреатит, трипсиноген, трипсин, катепсин В, Ca^{2+} , свободные радикалы кислорода

Более века назад Chiari (1896) высказал мнение о том, что поджелудочная железа (ПЖ) больных, умерших от острого панкреатита (ОП), "была погублена ее собственными пищеварительными свойствами", и сделал вывод, что "*панкреатическое самопереваривание*" лежит в основе патофизиологических механизмов данного заболевания [1]. С тех пор и до сегодняшнего дня этот термин остается весьма популярным как в отечественной, так и зарубежной медицинской литературе. В чем причина столь необычно долгой живучести гипотезы?

Экзокринная часть ПЖ, представленная ацинарными клетками, синтезирует и секретирует протеолитические пищеварительные проферменты-зимогены (трипсиноген, химоотрипсиноген, проэластазу, прокарбоксипептидазу), которые превращаются в каталитически активные формы в результате ограниченного протеолиза. Активация зимогенов в физиологических условиях осуществляется в тонком кишечнике. При этом под действием фермента энтерокиназы вначале происходит активация трипсиногена, после чего активный трипсин, в свою очередь, активирует остальные зимогены. Самым простым и, на первый взгляд,

естественным было предположение, что ОП возникает вследствие преждевременной активации протеолитических проферментов в самой ПЖ, с последующим её "самоперевариванием" и развитием ферментной токсемии, так называемого "феномена уклонения ферментов". При этом основная роль отводилась трипсину и трипсинонии. Также долгое время велись многочисленные споры на предмет того, где (в ацинусах или протоках) и как происходит активация зимогенов при ОП. И хотя на сегодняшний день доказано, что эти процессы реализуются в самой ацинарной клетке, по кардинальному вопросу - каким образом "запускается" ОП - единого мнения нет.

В защиту гипотезы о том, что внутриклеточная активация протеолитических зимогенов является одним из пусковых механизмов в патогенезе ОП, имеется целый ряд аргументов. Прежде всего, пептиды отщепляющиеся от трипсиногена и карбоксипептидазы А1, во время процесса активации, обнаруживаются в ткани ПЖ очень рано как при клиническом, так и экспериментальном ОП [2]. Показано также, что активность трипсина и эластазы в ткани ПЖ (при использовании различных экспериментальных моделей ОП) возрастает на очень ранних стадиях заболевания [3-5], а проникающие внутрь клетки синтетические ингибиторы сериновых протеаз (бензамидин, Пефаблок, габексата мезилат) уменьшают степень их повреждения [6]. В частности, премедикация gabexate mesilate снижает риск возникновения панкреатита после эндоскопической ретроградной холангиопанкреатографии [7]. Также установлено, что различные формы наследственно обусловленного панкреатита связаны с мутациями гена трипсиногена, которые могут способствовать преждевременной активации трипсиногена и большей устойчивости активного трипсина к разрушающему воздействию других протеаз [8-10]. Все эти наблюдения служат серьезными аргументами в пользу того, что внутриклеточная активация трипсиногена является ранним событием и играет значительную роль в возникновении ОП. Однако однозначного ответа, может ли внутриклеточная активация трипсиногена и других протеолитических ферментов быть не только начальным патогенетическим звеном развития ОП, запускающим целый ряд других патологических каскадных реакций, но и фактором, вызывающим панкреонекроз с дистантным повреждением органов вследствие "уклонения ферментов" и выходом их в системную циркуляцию, до сих пор не найдено.

Вопрос о том, каким образом вообще возможна активация трипсиногена внутри панкреатической ацинарной клетки, представляет отдельный интерес. На сегодняшний день известен целый ряд защитных механизмов, препятствующих повреждению клетки активным трипсином. Они нацелены как на предотвращение активации трипсиногена внутри клетки (содержание проэнзимов в грануле в виде химически и осмотически неактивных агрегатов; локализация зимогенов сериновых протеаз и их потенциальных активаторов - цистеиновых протеаз - в различных субклеточных компартментах; кислая рН в дистальных секреторных путях, включая зимогенные гранулы, лежащая вне оптимума для большинства протеолитических ферментов) [11], так и на блокировку действия уже проактивированных ферментов за счёт резистентности мембран гранул к активным ферментам [12] и наличия панкреатических ингибиторов сериновых протеаз - ингибитора трипсина Kassel [13] и поливалентного ингибитора протеаз [14], системы плазменных антипротеаз, а также деградации активных ферментов [15]. Однако среди широкого круга авторов серьезных обзорных работ последних лет продолжает сохраняться мнение, что "каскад активации ферментов следует за активацией трипсиногена в клетке и высвобождением активных ферментов в интерстиций" и даже что "при тяжелом остром панкреатите система инактивации протеаз может быть перекрыта, приводя к эксцессу циркулирующих протеаз" [16]. На чём основана эта точка зрения?

Фактически все прямые доказательства активации трипсиногена внутри панкреатической клетки получены на экспериментальных моделях ОП у

ПУСКОВЫЕ МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ ТРИПСИНОГЕНА ПРИ ОСТРОМ ПАНКРЕАТИТЕ

животных. Большинство этих моделей используют то обстоятельство, что стимуляция ПЖ секретогенами (холецистокинином и его синтетическим аналогом церулеином) в концентрациях как минимум в 2 раза больших, чем требуется для достижения максимального секреторного ответа, приводит к блоку ферментативной секреции у крыс, мышей, собак и к нетяжелому, отечному варианту панкреатита [11].

В дополнение к моделям *in vivo* были использованы изолированные функциональные субъединицы ПЖ - ацинусы. При экспозиции супрамаксимальных концентраций холецистокинина или церулеина интактная железа (*in vivo*) или изолированные ацинусы реагируют однотипно. Во-первых, секреция снижается после максимального уровня стимуляции, превышающего физиологический уровень. Этот эффект известен как высоко-дозовое ингибирование секреции в результате разрушения апикального актинового цитоскелета [17]. Во-вторых, активация протеаз обнаруживается после супрамаксимальной секретогенной стимуляции как *in vivo*, так и в изолированных ацинусах [3,5,6,18]. Воздействие другого пептидного гормона - бомбезина (синтетического аналога секретина), который также связывается с рецепторами, сопряженными с G-белком, хотя и стимулировало внутриклеточную активацию прокарбоксипептидазы и генерацию пептида активации трипсинагена (ТАП) через 30 мин стимуляции в изолированных ацинусах, но не вызывало клеточного повреждения и развития панкреатита *in vivo*. В отличие от холецистокинина и церулеина, супрамаксимальная концентрация бомбезина не ведет к ингибированию панкреатической секреции, бомбезин вызывает активацию зимогенов, при этом активные ферменты секретируются клеткой, а не удерживаются в ней [6]. *Важным выводом из этого является то, что для инициации панкреатита требуется не только активация протеаз, но и сохранение активированных ферментов в ацинарной клетке.*

Кроме блока апикальной секреции и накопления синтезируемых зимогенов в ацинарной клетке, необходимым условием внутриклеточной активации является фактор, непосредственно вызывающий отщепление пептида активации от молекулы трипсинагена. До сих пор не существует единой точки зрения по поводу того, в каком конкретно внутриклеточном компартменте и под действием какого агента происходит это отщепление. В зимогенных гранулах проферменты находятся в очень плотно упакованном виде, они окружены мембраной и химически неактивны. Авторы колокализационной теории считают, что активация трипсинагена происходит в аномальных цитоплазматических вакуолях за счет колокализации трипсинагена и лизосомальной гидролазы - катепсина В [1,11].

Известно, что появляющиеся при гиперсекретогенной стимуляции аномальные цитоплазматические вакуоли содержат не только активный трипсин, но и лизосомальный фермент - катепсин В [19]. В мембране этих вакуолей был также обнаружен мембранный белок-маркер лизосом и рециркулирующих эндосом [20]. Существует мнение, что активация цистеиновых гидролаз и неактивных пищеварительных протеаз внутри ацинарной клетки происходит именно вследствие их колокализации в цитоплазматических вакуолях [1,11]. Гипотеза основана на данных о возможности активирования трипсинагена катепсином В, полученных *in vitro* [21,22]. При этом было высказано предположение, что совместная локализация лизосомальных гидролаз и секреторных белков возникает благодаря дефектам внутриклеточного белкового транспорта и системы сортировки в ацинарной клетке. Было показано, что при гиперстимуляции изменения транспорта из эндоплазматической сети (ЭПС) в цистерны Гольджи не происходит, а нарушается транспорт в транспортных пузырьках, в частности, нарушается созревание конденсационных вакуолей в зимогенные гранулы. Это приводит к аккумуляции частично конденсированных вакуолей и к появлению крупных вакуолей, содержащих лизосомальную гидролазу катепсин D и вновь синтезированные пищеварительные зимогены. Источниками

катепсина D могут быть нарушенным сортиг, либо слияние вакуолей с лизосомами. После введения пульсовой метки (меченный тритием фенилаланин) зрелые гранулы обнаружены слившимися с большими вакуолями, содержащими катепсин D (процесс, аналогичный кринофагии). Таким образом, при стимуляции церулеином, вследствие нарушения созревания конденсационных вакуолей и кринофагии, образуются гетерогенные гранулы, содержащие смешанные вместе зимогены и лизосомальные гидролазы [23].

Однако колокализационная гипотеза встретила много критических высказываний, а ряд других экспериментальных наблюдений оказался несовместимым с ее положениями: 1) колокализация катепсина В с пищеварительными проферментами наблюдалась не только в начальной фазе ОП, но и в физиологических условиях; катепсин В секретировался вместе с пищеварительными зимогенами и при физиологической стимуляции секретогенами [24,25]; 2) введение мощных ингибиторов лизосомальных ферментов *in vivo* и *in vitro* не предотвращало развитие ОП [26]; 3) в экспериментах, где ингибиторы лизосомальных гидролаз использовались *in vitro*, было отмечено как снижение, так и нарастание скорости внутриклеточной активации трипсиногена [27]. У лишенных гена катепсина В мышей при воспроизведении гиперсекретогенной модели ОП активация трипсиногена (измеряемая по генерации ТАР) была снижена только на 50% по сравнению с животными дикого типа и соответствовала 50% снижения количества некротизированных клеток [28]. Хотя это и подтверждает, что катепсин В играет определенную роль в активации трипсиногена, похоже, что он не является единственным фактором, и, возможно, не является и пусковым.

В последние годы на роль универсального триггера ОП выдвигается возрастание в цитозоле ацинарной клетки содержания свободных ионов Ca , и, как следствие, изменение характера кальциевого сигнала на её апикальном полюсе. Физиологический кальциевый ответ обычно инициируется связыванием экстраклеточного мессенджера с сопряженным с G-белком рецептором и последующей активацией фосфолипазы C. Во многих клетках дальнейший сигнальный каскад включает гидролиз полифосфоинозитидов до инозитолтрифосфата (ИФ3) и диацилглицерола [29]. ИФ3 вызывает высвобождение Ca^{2+} из кальциевых депо, в частности, из ЭПС. На сегодняшний день считается, что физиологический стимул вызывает серию кальциевых осцилляций. Для многих клеточных типов, включая ацинарную клетку, возрастание концентрации Ca^{2+} является триггером экзоцитоза белков и ферментов [30]. При этом Ca^{2+} высвобождается из ЭПС и через специфические Ca^{2+} каналы проникает в апикальную область панкреоцита, где сосредоточены зимогенные гранулы. Это, в свою очередь, может вызвать Ca -индуцированное высвобождение Ca^{2+} через однотипные Ca^{2+} -каналы, имеющиеся и в зимогенных гранулах. При этом во время нормальной стимуляции, сопровождающейся секрецией, ионы кальция, высвобождаемые из зимогенных гранул в ответ на стимул, удаляются через люминальную мембрану в основном не путем экзоцитоза, а, скорее всего, с помощью Ca^{2+} -активируемых АТФаз [31]. Raraty et al. [32] показали, что в условиях гиперсекретогенной стимуляции холецистокинином кальциевые осцилляции исчезают, сменяясь платообразным повышением концентрации свободного Ca^{2+} в цитозоле, что сопровождается внутриклеточной активацией трипсиногена, наблюдающейся в апикальной гранулосодержащей области и связанной с интенсивным формированием вакуолей. При этом изменение характера кальциевого сигнала предшествует активации трипсиногена, которая обнаруживается с задержкой на 300 секунд [32]. Показано, что важна не столько амплитуда, сколько частота кальциевых осцилляций на апикальном полюсе клетки. Снижение частоты кальциевых осцилляций, вызываемое различными факторами (гиперсекретогенной стимуляцией, экспозицией клетки со свободными радикалами), приводит к нарушению нормального экзоцитоза и блоку апикальной секреции [33].

ПУСКОВЫЕ МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ ТРИПСИНОГЕНА ПРИ ОСТРОМ ПАНКРЕАТИТЕ

Однако блок апикальной секреции - необходимое, но не достаточное условие для развития ОП; как показано выше, требуется также и активация трипсинагена. Может ли изменение характера кальциевого сигнала иметь к этому отношение? В зимогенных гранулах наблюдается очень высокая концентрация общего кальция (15 мМ), но внутригранулярная концентрация свободного Ca^{2+} составляет только около 50 мкМ, то есть Ca^{2+} содержится в гранулах в основном в связанном виде [34]. Ca^{2+} важен для поддержания стабильности гранул, и индуцированный Ca^{2+} -ионофором выход Ca^{2+} из зимогенных гранул становится причиной их лизиса [35]. Рентгеновский микроанализ замороженных как водных, так и обезвоженных срезов ПЖ показал, что гиперстимуляция холецистокинином вызывает статистически значимый выход ионов Ca^{2+} из зимогенных гранул в цитоплазму и люминальное пространство, а также вхождение ионов K^+ из цитозоля в зимогенные гранулы через Ca^{2+} -активированные K^+ -каналы. [36,37]. Это может привести к Ca^{2+} - K^+ обмену в гранулярном матриксе, вызывающему дезагрегацию белков, поскольку, если Ca^{2+} стимулирует агрегацию белка в модельной системе, воспроизводящей *in vitro* процесс конденсации зимогенных гранул, K^+ , напротив, ингибирует конденсацию белка и связывание агрегатов с мембранами [38]. В этих условиях возможна и самоактивация трипсинагена в гранулах, и активация катепсина В, если действительно имеет место его физиологическое попадание в гранулярный компартмент. Показано, что блокатор кальциевых каналов верапамил в дозе 0,56 мкмоль в сутки при панкреатите у мышей, вызванном холин - дефицитной/этионин-обогащенной диетой, снижал растворение мембраны зимогенных гранул [39].

Независимо от того, истощалось ли внутриклеточное содержание Ca^{2+} ингибированием Ca^{2+} - АТФазы, изъятием Ca^{2+} из среды или комплексным воздействием через хелаторы Ca^{2+} , внутриклеточная активация протеаз в ответ на действие гормональной гиперстимуляции резко снижалась или отсутствовала вообще [18,32]. Возрастание внутриклеточной концентрации Ca^{2+} при действии ионофоров, однако, не вызывало преждевременной активации протеаз [18]. Возможно, это связано с тем, что изменение характера рецептор-опосредованного кальциевого сигнала принципиально отличается от эффекта, вызываемого простым вхождением Ca^{2+} в клетку из внешней среды под действием ионофоров.

Показано, что многие повреждающие факторы, способные вызвать ОП (алкоголь, гипоксия, гиперкальцемия, гиперлипидемия, некоторые фармпрепараты), способствуют также аномально высоким осцилляциям уровня Ca^{2+} . Поэтому можно считать, что при ОП Ca^{2+} является общим для различных этиологических факторов триггером, запускающим патологический процесс [12].

Возникает вопрос, каковы возможные механизмы повышения концентрации Са в цитозоле при ОП, не связанном с гиперсекретогенной стимуляцией? Одним из таких механизмов, скорее всего, является свободнорадикальное окисление. Приводятся данные, что при инкубации ацинарных клеток в СРК (свободные радикалы кислорода)-генерирующей системе, содержащей ксантиноксидазу, гипоксантин и хелатированные ионы железа, цитозольный Ca^{2+} немедленно возрастает на 26% [40]. Существующие работы показывают, что экспозиция ацинарных клеток с СРК не просто вызывает интенсивное возрастание Ca^{2+} , а приводит к изменению Ca^{2+} осцилляции, которая хотя и имеет сходную амплитуду с наблюдающейся при физиологическом стимуле, но характеризуется меньшей частотой [33]. На той же модели показано, что окислительный стресс вызывает лизис выделенных зимогенных гранул в течение нескольких минут, хотя существенная клеточная гибель наблюдается только через несколько часов. В ацинарных клетках СРК инициировали внутриклеточную вакуолизацию, морфологически определяемые нарушения в зимогенных гранулах и митохондриях, а так же возрастание ТАП и снижение АТФ уже через 5-30 минут. Предварительная стимуляция церулеином только слегка увеличивала чувствительность целых клеток к повреждению СРК, но гораздо значительно -

гранул. Этот результат показывает, что окислительный стресс также может вызывать быструю активацию трипсиногена, а зимогенные гранулы и митохондрии, похоже, являются важнейшими мишенями окислительного повреждения внутри ацинарных клеток [41]. При инкубации ацинарных клеток в СРК-генерирующей системе, митохондрии были наиболее чувствительными к окислительному стрессу (на субклеточном уровне). В соответствии с наблюдаемым повреждением митохондрий, активность митохондриальных дегидрогеназ снижалась на 70%, в то время как мембранный митохондриальный потенциал повышался на 27% после 120 минут инкубации. Все это вместе могло быть причиной снижения на 85% содержания концентрации АТФ и соответствующего снижения ADP/AMP, наблюдающихся параллельно [40].

На сегодняшний день установлено, что инициирующее внутриклеточную активацию трипсиногена изменение кальциевого сигнала, как опосредованное гиперсекретогенной стимуляцией, так и СРК-индуцированное, параллельно (и, скорее всего, независимо) через регуляцию кальциевых каналов, чувствительных к внутриклеточным запасам кальция, запускает другой внутриклеточный каскад, а именно каскад активации провоспалительных агентов. В работе Hann и Logsdon [42] показано, что воздействие супрамаксимальной концентрации холецистокинина индуцирует экспрессию хемокинов в ацинусах ПЖ крыс через активацию транскрипционного фактора NF- κ B [42]. В то же время, через 1 час после индукции таурохолатного панкреатита обнаружена интенсивная продукция СРК ацинарными клетками, колокализованная с ядерной транслокацией субъединицы p65 транскрипционного фактора NF- κ B [43,44]. На модели таурохолатного панкреатита показано, что уже через 2 минуты после введения таурохолата наблюдается обратимый спазм междольковых артериол, который предотвращается "ловушками" свободных радикалов. Спазм артериол сопровождается снижением скорости капиллярного кровотока [45]. Прямое определение генерации СРК в ткани ПЖ методом хемоллюминесценции при двух моделях панкреатита - церулеиновой и таурохолатной - показало, что пик хемоллюминесценции наблюдается соответственно через 20 и 15 минут после инициации ОП, возвращаясь затем к исходному уровню. Введение в панкреатический проток супероксиддисмутазы (15000 ед. на крысу) сразу после таурохолата приводило к существенному снижению как хемоллюминесценции, так и уровня амилазы в сыворотке крови [46]. Таким образом, тканевое повреждение на ранних этапах ОП может обуславливаться не столько действием активированных протеолитических ферментов, сколько быть следствием изменений, вызванных ишемией/реперфузией. Защитный эффект ингибитора ксантиноксидазы аллопуринола, а также вводимых совместно ферментов-антиоксидантов супероксиддисмутазы и каталазы, проявляющийся при их введении до- или одновременно с инициацией ОП, подтверждает значимость роли СРК на ранних этапах ОП [47,48].

Окислительный стресс на более поздних этапах панкреатита играет центральную роль в развитии системного воспалительного ответа, участвуя в возникновении внепанкреатических осложнений [47,49]. СРК, генерируемые инфильтрирующими нейтрофилами, являются важными регуляторами в патогенезе и развитии панкреатита. Отличительной особенностью воспалительного ответа является экспрессия гена цитокинов. В ацинарной клетке обработанные форбол-миристалом (ФМА) нейтрофилы увеличивали продукцию перекиси водорода, липоперекисей и цитокинов. Обработка форбол-миристалом нейтрофилов приводила к активации двух типов димеров NF- κ B в ацинарной клетке, а антиоксиданты N-ацетилцистеин и супероксиддисмутаза ингибировали индуцированные нейтрофилами и опосредованные СРК изменения [50]. Таким образом, на более поздних этапах ОП нейтрофилы не только сами генерируют свободные радикалы, но и вызывают их генерацию ацинарными клетками, запуская каскадный механизм клеточной деструкции.

ПУСКОВЫЕ МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ ТРИПСИНОГЕНА ПРИ ОСТРОМ ПАНКРЕАТИТЕ

Подводя итог вышесказанному, сегодня можно утверждать следующее:

- 1) активация протеаз при ОП происходит внутри ацинарной клетки и является ранним событием в патогенезе ОП;
- 2) внутриклеточная активация трипсиногена следует за изменением характера кальциевого сигнала на апикальном полюсе ацинарной клетки;
- 3) ещё раньше, чем происходит активация трипсиногена, регистрируются изменения внутриклеточного содержания Ca^{2+} ;
- 4) возрастание цитозольного содержания Ca^{2+} может быть вызвано СРК;
- 5) СРК сами по себе могут быть причиной внутриклеточных изменений, ведущих в преждевременной активации трипсиногена, а также непосредственной причиной клеточного повреждения;
- 6) СРК являются триггерами для запуска каскада активации провоспалительных факторов.

Таким образом, и на ранних, и, в особенности, на поздних этапах течения ОП, кроме внутриклеточной активации трипсиногена, иные факторы вносят существенный вклад в непосредственное повреждение ПЖ, а также в развитие системных осложнений. Каково же конкретное место и роль внутриклеточной активации пищеварительных ферментов в происходящих событиях?

На гиперсекретогенной модели панкреатита показано, что сама по себе внутриклеточная активация трипсиногена не достигает уровня, который может быть причиной "самопереваривания" ПЖ. Несмотря на зарегистрированную внутриклеточную активацию трипсиногена, "панкреатическое самопереваривание" не наблюдалось при церулеиновом панкреатите даже через 3 часа [5]. Не наблюдается оно и в более поздние сроки. Церулеиновый панкреатит представляет собой аналог отёчного ОП у человека, при котором имеющиеся морфологические изменения регрессируют сами по себе. Высокий уровень трипсиногена в портальной крови и лимфе показывает, что интерстициальный пул трипсиногена быстро вымывается из железы, не являясь при этом причиной дальнейших повреждений [51]. Однако именно при воспроизведении этой модели удалось обнаружить активный трипсин в гомогенатах ПЖ грызунов [3-5]. В доступной нам литературе не обнаружено работ, в которых протеолитически активный трипсин (а не ТАП, и не связанный с α_2 -макроглобулином и обладающий эстеразной активностью трипсин [52]) в гомогенате был бы обнаружен при воспроизведении других моделей ОП (билиарной или таурохолатной - этиологически более схожих с ОП человека) и у других видов животных. Показано, что церулеиновый панкреатит приводит к высвобождению в интерстициальное пространство большого количества трипсиногена вследствие некрозов отдельных клеток (через их поврежденные мембраны). Очень многие авторы считают, что "аккумуляция трипсиногена в интерстиции может иметь критическое значение" [5], ссылаясь при этом на работу Hartwig et al. (1999), получивших массивный панкреонекроз при модельной активации интерстициального пула трипсиногена энтерокиназой [51]. Однако без такой активации активный трипсин в интерстициальной жидкости обнаружен не был [51], и не существует пока даже гипотетического триггера, способного сыграть роль такого локального активатора.

Гиперсекретогенная стимуляция выделенных ацинусов ПЖ крыс, приводя к появлению в клетке активного трипсина, действительно сопровождается повреждением ацинарных клеток, которое оценивалось по выходу в среду инкубации ЛДГ и по включению трипанового синего. Внутриклеточный ингибитор трипсина Пефаблук полностью, а бензамидин частично предотвращали клеточные повреждения [6,19]. Однако это вовсе не означает, что обнаруженное повреждение обуславливается разрушением клеточной мембраны непосредственно трипсином. В работе Niederau [53] показано, что панкреатическая эластаза в наномолярных концентрациях вызывала выраженные клеточные повреждения через 45-90 минут инкубации с выделенными ацинусами. Воздействие липазы и химотрипсина приводило к сходным изменениям в

микромольных концентрациях, в то время как даже миллимольные концентрации трипсина были недостаточны, для того чтобы вызвать существенные повреждения [53].

Инкубация ацинусов с гомогенатом поджелудочной железы, активированным энтерокиназой, приводит к статистически достоверному увеличению выхода из ацинарных клеток ^{35}S -метионин-меченых белков. При добавлении к среде инкубации ингибитора сериновых протеаз апротинина активность трипсина активированного гомогената снижалась в 34 раза, в то время как выход меченых белков оставался на том же уровне. При внесении в среду инкубации НК 42 (синтетического ингибитора фосфолипазы A_2) в концентрации 10^{-4} М активность трипсина оставалась неизменной, а выход меченых белков из ацинарных клеток снижался с 30,2% до 6%. Через 3 часа инкубации клеток в генерирующей супероксидный радикал системе гипоксантин-ксантиноксидаза также наблюдалось почти четырехкратное увеличение выхода меченых белков, снижавшееся при добавлении в среду ингибитора ксантиноксидазы - аллопуринола [54]. Таким образом, хотя активация трипсина и может быть триггером для начала каскада активации при ОП, сам по себе трипсин серьезной опасности для ацинарной клетки не представляет. Вероятно, значительно большую опасность внутри клетки могут иметь активированные им другие протеолитические ферменты, такие, как эластаза и металлопротеазы, а также фосфолипаза A_2 , генерирующая токсичный для клетки лизолецитин, хотя на модели церулеинового панкреатита показано, что и они не могут быть причиной серьезного повреждения. Поскольку снаружи ацинарной клетки активные протеолитические ферменты не обнаруживаются, нельзя всерьез вести речь о том, что "большое количество высвобожденного трипсина перекрывает защитные механизмы поджелудочной железы и системно циркулирующих антипротеаз" [55].

Исследование динамики содержания в плазме и перитонеальном экссудате иммунореактивного трипсина, его комплексов с α_1 -антитрипсином, и основных плазменных ингибиторов сериновых протеаз у больных с тяжелым ОП показало, что применение лаважа с апротинином (действующим как ингибитор на человеческий трипсин, плазмин, плазменный калликреин и тканевой калликреин, но не имеющем эффекта в отношении лейкоцитарных протеаз) не меняло содержания плазменных антипротеаз. Две группы больных не отличались статистически по содержанию α_2 -макроглобулина в плазме, которое было субнормальным в обеих группах до лечения и оставалось таковым в течение всего периода наблюдения. Также не было статистических различий между двумя группами по уровню в плазме α_1 -антитрипсина, которое было нормальным при поступлении, возрастало в течение первых нескольких дней и оставалось выше нормы в течение всего периода наблюдения [56]. Приведенные данные свидетельствуют, что даже при тяжелом ОП "недостаточности плазменных ингибиторов крови" не наблюдается. Поэтому предположения о том, что "система инактивации протеаз (имеются в виду плазменные антипротеазы) может быть перекрыта, приводя к избытку циркулирующих протеаз" [16], выглядят не убедительно.

Однако все сказанное не означает, что появление активного трипсина внутри ацинарной клетки безопасно для нее и организма в целом. Выше уже шла речь об опасности для ацинарной клетки активируемых им металлопротеаз и фосфолипазы A_2 . Большую опасность может представлять также активация трипсином тканевого калликреина. ПЖ - орган с высочайшим содержанием прекалликреина, при этом уровень панкреатического кининогена достигает 20-30 % от плазменного. Активация прекалликреина может осуществляться целым рядом присутствующих в железе ферментов, в том числе и активным трипсином. Кроме того, активированные протеазы, такие как эластаза и трипсин, а также лизосомальный катепсин D, могут сами, хотя и с меньшей специфичностью, превращать кининоген в брадикинин и каллидин. Кинины вызывают расширение

ПУСКОВЫЕ МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ ТРИПСИНОГЕНА ПРИ ОСТРОМ ПАНКРЕАТИТЕ

больших и малых артерий, не действуя при этом на посткапиллярные венулы (либо вызывая их слабый спазм), кроме того, повышают сосудистую проницаемость капилляров и играют важную роль в развитии воспаления [57].

Внутриклеточная активация трипсиногена может приводить к появлению и выбросу в системную циркуляцию большого количества олигопептидов, являющихся продуктом аутогидролиза самого трипсина и других пищеварительных ферментов. Аминокислоты гистидин и серин являются "каталитическим ключом" активных центров сериновых протеаз. Показано, что дипептид серил-гистидин и "родственные" ему олигопептиды способны сами гидролизовать ДНК и белки в широком диапазоне pH и температуры [58]. Так называемый "фактор депрессии миокарда" (МДФ), обнаруженный в плазме животных и человека при различных формах циркуляторного шока, представляет собой группу пептидов с молекулярным весом от 500 до 1000 Да и формируется ишемизированной ПЖ. Считается, что за продукцию МДФ ответственны лизосомальные гидролазы ПЖ. И хотя печень, селезенка и кишечник также могут высвобождать большое количество лизосомальных протеаз во время шока, ни один из этих органов, за исключением ПЖ, не способен продуцировать МДФ *in vitro*. Данные, приведенные в работах Lefer и Barenholz [59], также Spath и соавторы. [60], свидетельствуют об участии панкреатических протеаз в генерации МДФ. Вполне вероятно, что МДФ образуется в результате протеолитического расщепления как сериновых, так и цистеиновых протеаз (и сериновых проэнзимов). Внутриклеточно активированный трипсиноген может вносить существенный вклад в генерацию МДФ, расщепляя химотрипсиноген, проэластазу и профосфолипазу A₂ до биологически активных пептидов.

В заключение следует отметить, что клинические наблюдения и экспериментальные исследования последних лет показали, что тяжесть ОП определяется не "самоперевариванием" ПЖ и не выброшенными из поврежденных клеток ацинусов пищеварительными ферментами - "феноменом уклонения ферментов", а запуском каскада событий, приводящих к развитию синдрома системного воспалительного ответа (SIRS). Поэтому вполне естественно, что поиск новых фармакологических средств лечения ОП ведется среди агентов, способных блокировать определенные участки цитокинового каскада.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lerch M.M., Gorelick F.S. (2000) Med. Clin. North. Am., **84**, 549-563.
2. Foitzik T., Fernandez-del Castillo C., Lewandrowski K.B. (1994) Chirurh, **65**, 186-189.
3. Bialek R., Willemer S., Arnold R., Adler G. (1991) Scand. J. Gastroenterol, **26**, 190-196.
4. Hofbauer B., Saluja A.K., Lerch M.M. et al. (1998) J. Watch, **275**, 352-362.
5. Mithofer K., Fernandes-del Castillo C., Ratter D. et al. (1998) Am. J. Physiol, **274**, 71-79.
6. Grady T., Mah'Moud M., Otany T. et al. (1998) Am. J. Physiol., **275**, 1010-1017.
7. Karne S., Gorelick F.S. (1999) Surg. Clin. North Am., **79**, 699-710.
8. O' Reilly D.A., Kingsnorth A.N. (2000) Brit. J. Surg., **87**, 708-717.
9. Perrault J. (2000) Med. Clin. North. Am., **84**, 519-529.
10. Whitcomb D.C. (2000) Med. Clin. North. Am., **84**, 531-547.
11. Gorelick F.S., Otani T. (1999) Baillier's Clin. Gastroenterol, **13**, 227-240.
12. Klar E., Werner J. (2000) Chirurh, **71**, 253-264.
13. Веремеенко К.Н., Голобородько О.П., Кизим А.И. (1988) Протеолиз в норме и при патологии. Киев: Здоров'я.

14. Логинов А.С., Амиров Н.Ш., Чернаярова Л.Д. (1982) Физиол. журн., **68**, 692 - 698.
15. Kassel B., Kay J. (1973) Science, **180**, 1022-1027.
16. Windsor J.A., Hammodat H. (2000) World J. Surg., **24**, 664-672.
17. Jungermann J., Lerch M.M., Weidenbach H. (1995) Am. J. Physiol, **268**, 328-388.
18. Saluja A.K., Bhagat L., Lee H.S. et al. (1999) Am. J. Physiol, **276**, 835-842.
19. Saluja A.K., Hashimoto S., Saluja A. et al. (1987) Am. J. Physiol, **254**, 508-516.
20. Otani T., Chepliko S.M., Grendell J.H. (1998) Am. J. Physiol, **275**, 999-1009.
21. Figarella C., Miszczuk-Jamska B., Barrett A.J. (1988) J. Biol. Chem. Hoppe-Seyer, **369**, 293-298.
22. Greenbaum L.M., Hirshkowitz A., Shoichet I. (1959) J. Biol. Chem., **234**, 2885-2890.
23. Saito I., Hashimoto S., Saluja A. (1987) Am. J. Physiol, **253**, 517-526.
24. Hirano T., Manabe T., Printz H. et al. (1992) Nippon Geka Hokan, **61**, 103-124.
25. Hirano T., Saluja A., Ramarao P. et al. (1991) J. Clin. Invest, **87**, 865-869.
26. Halangk W., Sturzebecher J., Matthias R. et al. (1997) Biochem. Biophys. Acta, **1362**, 243-251.
27. Lerch M.M., Halangk W., Kruger B. (2000) Adv. Exp. Med. Biol., **477**, 403-411.
28. Halangk W., Lerch M.M., Brandt-Nedelev B. et al. (2000) J. Clin. Invest, **106**, 773-781.
29. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. (1994) Молекулярная биология клетки: В 3-х т. Т.1. Пер с англ.. М.: Мир.
30. Pareekh A.B. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97**, 12933-12934.
31. Belan P.V., Gerasimenko O.V., Tepikin A.V. et al. (1996) J. Virology, **271**, 7615-7619.
32. Raraty M., Ward J., Erdemli G. et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97**, 13126-13131.
33. Niederau C., Luthen R., Klonowski-Stumpe H. et al. (1999) Hepato-Gastroenterol, **46**, 2723-2730.
34. Gerasimenko O.V., Gerasimenko J.V., Belan P.V., Petersen O.H. (1996) Cell, **84**, 473-480.
35. LeBel D., Grondin G., Cook S., Hooper N.M. (1998) J. Histochem. Cytochem, **46**, 841-846.
36. Nguyen T., Chin W.C., Verdugo P. (1998) Nature, **395**, 908-912.
37. Sasaki S., Nakagaki I., Kondo H., Hori S. (1996) Pflugers Arch., **432**, 538-545.
38. Dartsch H., Kleene R., Kern H.F. (1998) Eur. J. Cell. Biol., **75**, 211-222.
39. Lake-Bakaar G., Lyubsky S. (1995) Dig. Dis. Sci., **40**, 2349-2355.
40. Weber H., Roesner J.R., Nebe B. et al. (1998) Digestion, **59**, 175-185.
41. Niederau C., Klonowski H., Schulz H.U. et al. (1996) Free Radic. Biol. Med., **20**, 877-886.
42. Han B., Logsdon C.D. (2000) Am. J. Physiol, **278**, 344-351.
43. Telek G., Scoazec J.Y., Chariot J. et al. (1999) J. Histochem. Cytochem, **47**, 1201-1212.
44. Telek G., Ducroc R., Scoazec J.Y. et al. (2001) J. Surg. Res., **96**, 56-67.
45. Kusterer K., Poschmann T., Friedemann A. et al. (1993) Am. J. Physiol, **265**, 165-171.
46. Schoenberg M.H., Buchler M., Beger H.G. (1994) Hepato-Gastroenterol, **41**, 313-319.
47. Czako L., Takacs T., Varga I.S. et al. (2000) Int. J. Pancreatol, **27**, 209-216.
48. Rau B., Poch B., Gansauge F. et al. (2000) Ann. Surg., **231**, 352-360.
49. Folch E., Gelpi E., Rosello-Catafau J., Closa D. (1998) Dig. Dis. Sci., **43**, 2405-2410.
50. Kim H., Seo J.Y., Roh K.H. et al. (2000) Free Radic. Biol. Med., **29**, 674-684.
51. Hartwig W., Jimenez R.E., Werner J. et al. (1999) Gastroenterol, **117**, 717-725.

ПУСКОВЫЕ МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ ТРИПСИНОГЕНА ПРИ ОСТРОМ ПАНКРЕАТИТЕ

52. *Luthen R., Niederau C., Grendell J.H.* (1995) *Am. J. Physiol*, **268**, 592-604.
53. *Niederau C., Fronhoffs K., Klonowski H., Schulz H.U.* (1995) *J. Lab. Clin. Med.*, **125**, 265-275.
54. *Mossner J., Wessig C., Ogami Y., Keim V.* (2000) *Int. J. Pancreatol*, **27**, 29-38.
55. *Steinberg W., Tenner S.* (1994) *N. Engl. J. Med.*, **330**, 1198-1210.
56. *Berling R., Borgstrom A., Ohlsson K.* (1998) *Int. J. Pancreatol*, **24**, 9-17.
57. *Griesbacher T.* (2000) *Pharmacology*, **60**, 113-120.
58. *Li Y., Zhao Y., Hatfield S. et al.* (2000) *Bioorg. Med. Chem.*, **8**, 2675-2680.
59. *Lefer A.M., Barenholz Y.* (1972) *Am. J. Physiol*, **223**, 1103-1109.
60. *Spath J.A., Gorczyński R.J., Lefer A.M.* (1974) *Am. J. Physiol*, **226**, 443-451.

Поступила 28.02.2003

STARTING MECHANISMS OF TRYPSINOGEN ACTIVATION AND THE ROLE OF TRYPSIN IN PATHOGENESIS OF ACUTE PANCREATITIS.

Shabanov V.V.

Samara Military Medical Institute.
22 Pionerskaja Street, Samara 443099 Russia;
fax: (8462) 37-11-22, 34-11-28; e-mail: sjuris@rs34.ssau.ru

Early events critical for the development acute pancreatitis are considered. The possible initiating mechanisms of intracellular trypsinogen activation are discussed. Essential attention is paid to the role of cathepsin B, intraacinar $[Ca^{2+}]$ increase and free radicals generation in the premature zimogen activation. It is demonstrated, that the trypsinogen activation alone may not be sufficient to cause acinar cell injury. Some factors, other than active trypsin, play a main role in the pancreatic damage and in the development of systemic complications of acute pancreatitis.

Key words: acute pancreatitis, trypsinogen, trypsin, cathepsin B, Ca^{2+} , oxygen free radicals.