



О.О. Крилова

ДУ «Інститут гастроентерології АМН України»,
Дніпропетровськ

Локалізація проапоптичних протеаз ДНКаз I та ендонуклеази-G у підшлунковій залозі хворих на хронічний панкреатит

Ключові слова

Підшлункова залоза, хронічний панкреатит, апоптоз, ДНКаз I, ендонуклеаза-G.

Апоптоз є загальнобіологічним механізмом, відповідальним за підтримку сталості чисельності клітинних популяцій, а також за формування й вибракування дефектних клітин. Порушення регуляції апоптозу призводить до розвитку захворювань, пов'язаних з посиленням або, навпаки, інгібуванням апоптозу [1–4, 6].

Апоптоз відбувається як у клітинах неушкоджених тканин, так і в тканинах з наявністю патологічного процесу. Смерть клітини може бути корисною для елімінації тих клітин, виживання яких шкідливе для організму в цілому, наприклад, клітин-мутантів або клітин, уражених вірусом.

Процес регульованої клітинної загибелі умовно можна розподілити на кілька фаз: ініціації апоптозу, проведення сигналу, активації каспаз, активації ендонуклеаз і специфічної деградації ДНК, унаслідок чого настає загибель клітини.

Якщо початкові фази відрізняються залежно від типу клітин і апоптоз-індукуючого сигналу, то етап деградації ДНК є універсальним для більшості клітин. Ця фаза — перехід до незворотної, термінальної стадії апоптозу, яку контролюють білки сімейства Bcl-2, похідні однойменних генів [1]. Показано, що експресія ацинарного Bcl-2 блокує апоптотичний індекс ацинарних клітин підшлункової залози (ПЗ). Відзначено, що величина проліферативного індексу у паренхімі ПЗ є вищою при хронічному панкреатиті [5, 8, 10].

Стадія реалізації програми апоптозу (ефекторна) полягає у власне загибелі клітини, яка

настає внаслідок активації протеолітичного й нуклеолітичного каскадів.

Безпосередніми виконавцями процесу «умертвіння» клітини є Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежні ендонуклеази (каталізують розпад нуклеїнових кислот) і ефекторні каспази (піддають протеолітичному розщепленню різні білки, зокрема білки цитоскелета ядра, регуляторні білки й ферменти) [7].

Фермент ендонуклеаза, здатний фрагментувати ДНК, активується при значному підвищенні рівня зольного кальцію в клітині. Збільшення вмісту ендонуклеази є обов'язковим маркером апоптозу. Зміна рН цитоплазми запускає синтез АТФ — початок фрагментації ДНК [9, 13]. Далі активізується ядерний фермент ПАРП (полі-АДФ-рибозил-полімераза), що є ферментом репарації ДНК.

Вважають, що ПАРП у комплексі з ДНК-лігазою перешкоджають розходженню кінців розірваних ниток ДНК і сприяють склеюванню розривів. Однак при множинних ушкодженнях ДНК, тобто при посиленні апоптозу, цей захисний механізм, який потребує великої кількості енергії й наявності макроергічних сполук, спричиняє зменшення пулу НАДФ і порушення синтезу макроергічних сполук [9].

У результаті руйнування білків і хроматину в процесі апоптозу відбувається деструкція клітини. У ній формуються і відокремлюються фрагменти, які містять залишки органел, цитоплазми, хроматину й цитолемми — апоптозні тільця.

Апоптоз відіграє провідну роль у загибелі ацинусів при хронічному панкреатиті (ХП). На моделях, виконаних на лабораторних щурах, при дефіциті міді, введенні етанолу чи лігуванні панкреатичної протоки розвивається апоптоз ацинарних клітин і атрофія ПЗ. На моделях у гризунів, які приймали етанол або були на безбілковій дієті, розвивалась ацинарно-клітинна атрофія ПЗ [5, 8, 10].

Типовими морфологічними ознаками апоптозу є конденсація цитоплазми клітин, конденсація і маргіналія нуклеолярного хроматину, фрагментація ядер. По закінченні процесу клітини поділяються на невеличкі фрагменти цитоплазми, обмежені мембраною.

Мета дослідження — вивчити особливості розподілу проапоптичних протеаз ДНКазі I та ендонуклеазі-G у підшлунковій залозі при хронічному панкреатиті.

Матеріали та методи

Обстежено 37 хворих на ХП. Біоптати ПЗ забирали під час планових операцій на органі за допомогою тонкогочастої аспіраційної біопсії (ТАБ) під ультразвуковим контролем. Тканинний матеріал фіксували в рідині Буена, проводили через ряд спиртів, заключали в парафін. Гістологічні зрізи товщиною 5 мкм фарбували гематоксиліном-еозином, а також за Маллорі — Слінченком. Особливості гістоструктури ПЗ оцінювали за Stolte (1987), при цьому класифікували дифузний, або сегментарний фіброз, який поділяли на ступені: ступінь I — легкий фіброз (переважно перилобулярний фіброз; з легкою атрофією або без атрофії екзокринної паренхіми); ступінь II — помірний фіброз (фіброз поширюється на частки ПЗ; супроводжується помірною атрофією екзокринної паренхіми); ступінь III — високий ступінь фіброзу (зони інтралобулярного фіброзу зливаючись формують широкі поля фіброзу; характерна тяжка атрофія екзокринної паренхіми); ступінь IV — повний фіброз (значна фіброзна реконструкція ПЗ з повною деструкцією екзокринної паренхіми) [11].

Імуногістохімічне типкування проапоптичних протеаз (ендонуклеазі-G та ДНКазі I) проводили на гістологічних препаратах за допомогою непрямої авідін-стрептавідин-пероскидазної реакції. Використовували комерційні реактиви: кролячі антитіла до ДНК-ази I та ендонуклеазі-G (розведення — 1:500—1:2000, інкубація — 12 год, $t = +4\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Дана робота є фрагментом наукової теми «Вивчення механізмів розвитку ускладнень хронічного панкреатиту, розробка методів діагностики хірургічного лікування з використанням малоінва-

зивних технологій», шифр теми ВН.25.01.001.08, номер держреєстрації 0107U012136.

Результати та обговорення

У хворих виявляли ознаки ураження паренхіми ПЗ, типові для ХП: розростання сполучної тканини навколо проток і між часточками, між ацинусами, які деформовані і місцями зникають; запальний інфільтрат, переважно вогнищева інфільтрація Т-лімфоцитами. Інсулярна тканина представлена збереженою ендокринною тканиною і тубуло-інсулярними комплексами як ознакою відтвореної інсулярної тканини в умовах активної регенерації екзокринної частини ПЗ при ХП [12].

У хворих на ХП виявляли дифузний, або сегментарний фіброз. І стадію фіброзу ПЗ спостерігали у 10,8 % хворих. Процес характеризувався перилобулярним фіброзом, відсутністю атрофії екзокринної паренхіми та інсул.

Гістологічна картина, яка відповідала II ступеню фіброзу ПЗ, мала місце у 13,5 % хворих. При цьому спостерігався сегментарний фіброз, сполучна тканина огортала частки та проникала в міжчасткові відділи. В сполучній тканині, яка складалася переважно з молоді пухкої тканини, виявлено слабку лімфогістиоцитарну інфільтрацію строми. Острівці — інтактні, протоки незмінні.

У 62,2 % пацієнтів виявлено III ступінь фіброзу. Атрофована ацинарна паренхіма відокремлена внутрішньолобулярними фіброзними септами, які, зливаючись, формували широкі фіброзні поля. Типовою була значна атрофія ацинусів. У 1 хворого виявлено вогнищевий некроз паренхіми. Характерним для нього було набухання і лізис ацинарних клітин, накопичення в зоні некрозу великої кількості макрофагів, набряк строми.

У 13,5 % хворих виявлено IV ступінь фіброзу — повну атрофію частини екзокринної тканини і щільний фіброз ПЗ, при цьому поля фіброзної тканини були незначно інфільтровані лімфоцитами.

При високому ступені фіброзу і повному фіброзі ПЗ сполучна тканина огортає безмієлінові нерви, спостерігається розширення проток, поява в них кальцинатів, дисплазія і сквамозна метаплазія епітелію проток (у 2,7 % хворих). Це спричиняє прогресування панкреатиту, появу стійкого больового синдрому, розвиток передкарциномного стану залози.

На всіх стадіях розвитку ХП у частках залози трапляються поодинокі ацинарні клітини в стані апоптозу, що свідчить про постійність відмирання клітин при ХП. Ці ацинарні клітини еозинофільні, мають полігональну форму, зі зморщеним надмірно базофільним ядром.

У хворих на ХП, ускладнений утворенням псевдокісти, встановлено, що псевдокісти паренхіми ПЗ формувалися при ушкодженні паренхіми органа, що супроводжувалося вогнищевим скупченням сегментоядерних нейтрофілів та лімфоцитів (рис. 1) з деструктивними змінами в паренхімі. В подальшому на місці ушкодження формується тканина, подібна до грануляційної (рис. 2). У цій тканині можна спостерігати багато кровоносних капілярів та клітин, зокрема багато ядерних, в цитоплазмі яких виявлявся жовто-коричневий пігмент (ліпофусцин) (рис. 3). Основною особливістю стінок псевдокіст була відсутність епітеліальної вистілки, такі кісти були сформовані з грубої фіброзної тканини і заповнені рідким матриксом. В умовах обтурації головної вивідної протоки ПЗ просвіт її був розширений, інколи виявлялися кісти, частково встелені протоковим епітелієм, що, ймовірно, вказувало на їхнє протокове походження (рис. 4).

Апоптоз відіграє важливу роль у створенні цих кіст (рис. 5). При кістоутворенні в ядрах клітин дегенерованого протокового епітелію спостерігається експресія ендонуклеази-G (рис. 6).

За результатами імуногістохімічних досліджень зразків ПЗ хворих виявлено локалізацію проапоптичних протеаз у структурах ПЗ на різних стадіях фіброзу. Проапоптична протеаза ДНКаза I виявлена в цитоплазмі тільки ацинарних клітин ПЗ (табл. 1).

На всіх стадіях фіброзу ХП в частках ПЗ знайдено поодинокі ацинарні клітини з транслокацією нуклеази як раннього маркера апоптозу з цитоплазми в ядро клітин (рис. 7, 8).

Виявлено виражену експресію ендонуклеази-G у цитоплазмі невеликої частини ендокринних клітин — інсул ПЗ, а в цитоплазмі епітеліальних клітин проток спостерігалася помітна, але слабка реакція (рис. 9).

Клітини, в цитоплазмі яких спостерігалася експресія ендонуклеази-G, переважно розташовувалися по периферії острівця Лангерганса. Ймовірно, ці клітини є камбіальними, або регуляторними, для ендокринної тканини ПЗ. При III–IV стадіях фіброзу ПЗ у хворих знайдено тубулярні комплекси, які склалися з внутрішньочасткових проток з наявністю в кінцевих відділах групи ендокринних клітин. У цих комплексах обов'язково наявні ендонуклеаза-G-позитивні ендокринні клітини (рис. 10, 11).

Апоптоз легко розпізнається при світловій мікроскопії. Він визначається переважно в ацинарній тканині ПЗ при ХП. Цей факт сам по собі свідчить про більшу стійкість ендокринної тканини до запальних уражень порівняно з екзокринною. Як відомо, екзо- і ендокринні частини

ПЗ мають різне ембріональне походження і функції. Ймовірно, цим і пояснюється різниця в частоті виявлення в них апоптозу. Різна локалізація проапоптичних протеаз в ПЗ (ДНКази I — в екзокринній частині, а ендонуклеази-G — в ендокринній) свідчить про функціонування різних апоптотичних механізмів ушкодження екзокринної та ендокринної частин при ХП.

Виявлено, що за відсутності склерозу ПЗ частка ендонуклеази-G-позитивних клітин становить 2,6 %, а при III стадії фіброзу — 15,7 % (табл. 2). Таким чином, збільшення частки ендонуклеази-G-позитивних клітин в ендокринній тканині ПЗ зумовлене розвитком фіброзу ПЗ при ХП.

При розвитку ХП зазвичай зберігається ендокринна частина ПЗ, це відбувається внаслідок більшої стійкості ендокринної тканини до ураження та активних процесів регенерації. Однак є випадки, коли регенерація стає патологічною з формуванням незидіобластозу та ендокринно-активних пухлин. Ми виявили незидіобластоз у хворого на ХП, ускладнений псевдокістою. У пацієнта спостерігався повний фіброз ПЗ з дефіцитом екзокринної тканини, серед щільної сполучної тканини були лінійно розташовані дрібні тяжі ендокринної тканини. Поряд з ендокринними тяжами виявлено округлої форми острівці Лангерганса значних розмірів, добре васкуляризовані.

Висновки

Таким чином, при ХП проапоптичні протеази ДНКази I і ендонуклеаза-G експресуються в цитоплазмі клітин різних частин ПЗ: ДНКази I — в

Таблиця 1. Локалізація апоптотичних нуклеаз у структурах ПЗ

Фермент	Структура ПЗ		
	Ацинарна клітина	Протока	Інсула
ДНКаза I	+	—	—
Ендонуклеаза-G	—	+	+

Таблиця 2. Експресія ендонуклеази-G залежно від вираженості фіброзу ПЗ

Стадія фіброзу	Кількість ендонуклеаза-G-позитивних клітин	Кількість ендонуклеаза-G-негативних клітин	Частка ендонуклеаза-G-позитивних клітин
I	36 ± 3	140 ± 3	2,6 %
III	11 ± 3	70 ± 3	15,7 %

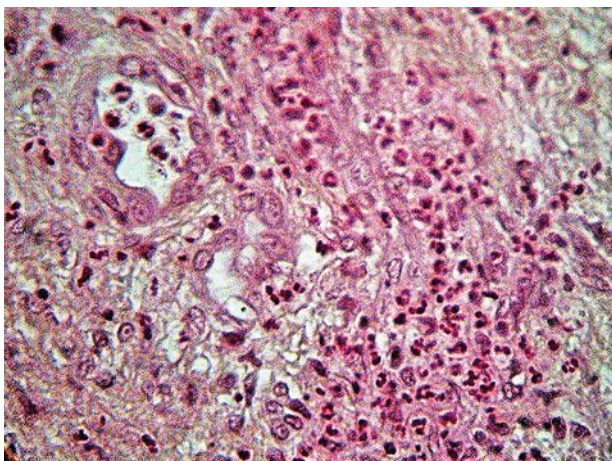


Рис. 1. Вогнищеве запалення паренхіми ПЗ з деструкцією ацинарної тканини. Фарбування гематоксиліном-еозином. $\times 400$

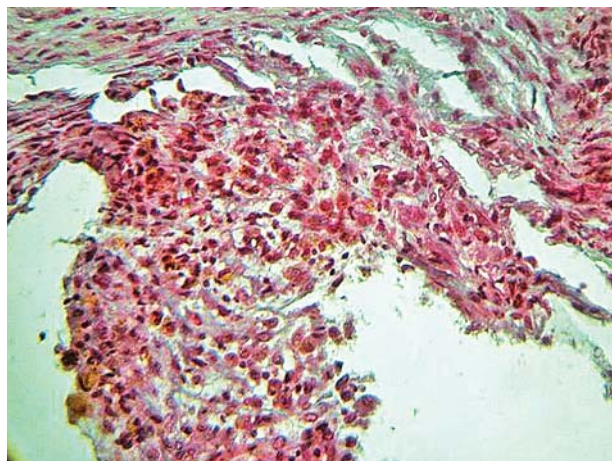


Рис. 2. Хронічне запалення паренхіми ПЗ із деструкцією основних морфологічних структур, із заміщенням їх грануляційною та фіброзною тканиною. Фарбування гематоксиліном-еозином. $\times 200$

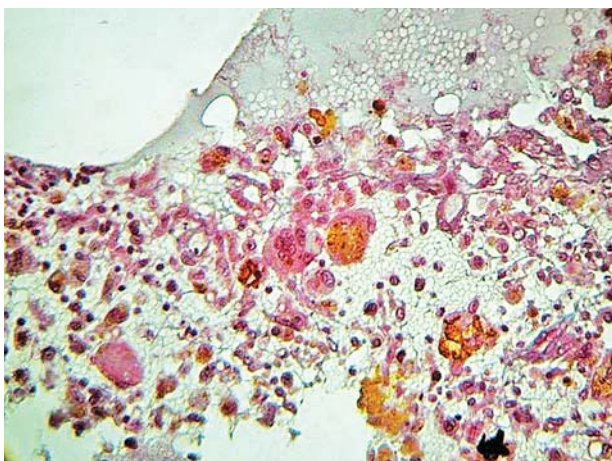


Рис. 3. Грануляційна тканина з багатоядерними клітинами, в цитоплазмі частини цих клітин міститься пігмент жовто-коричневого кольору. Фарбування за Маллорі—Слінченком. $\times 200$.

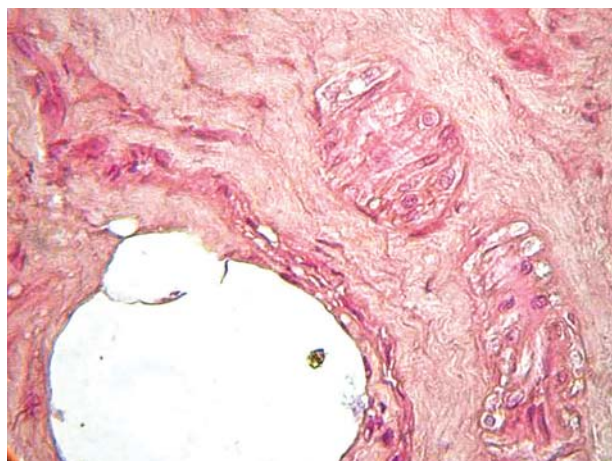


Рис. 4. Повний фіброз ПЗ. Псевдокіста частково встелена протоковим епітелієм. Фарбування гематоксиліном-еозином. $\times 200$

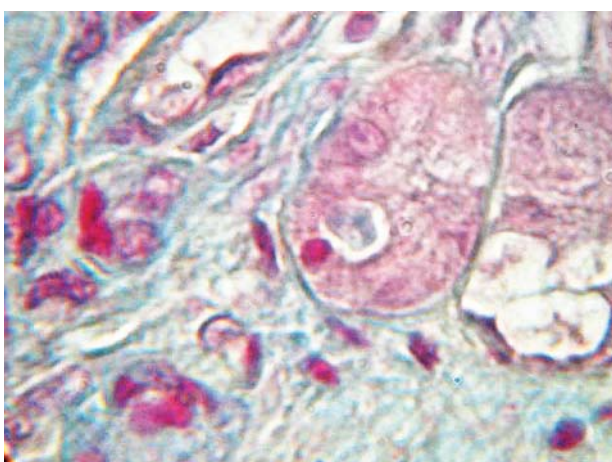


Рис. 5. Апоптоз в ацинарних клітинах. Праворуч видно три апоптотично змінені клітини. Фарбування за Маллорі—Слінченком. $\times 1000$

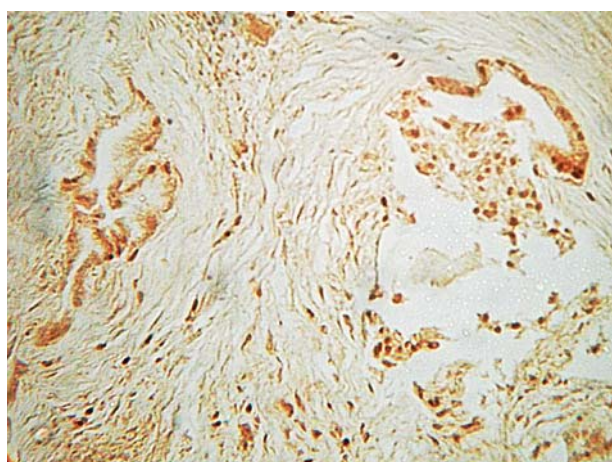


Рис. 6. Формування кісти. Транслокація проапоптотичної ендонуклеази-G в ядра протокових клітин. Непряма імунопереоксидазна реакція. ДАБ-реакція. $\times 100$

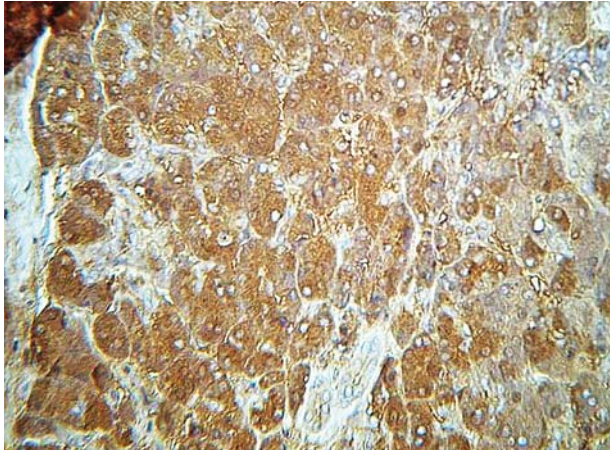


Рис. 7. I стадія фіброзу ПЗ. Проапоптична протеаза ДНКаз I розташована в цитоплазмі ацинарних клітин ацинусів ПЗ. Непряма імунопероксидазна реакція з підфарбуванням ядер клітин гематоксиліном, ДАБ-реакція. $\times 400$

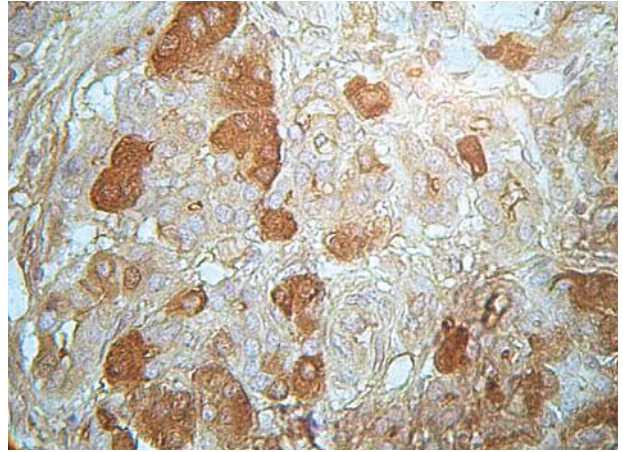


Рис. 8. III стадія фіброзу ПЗ, експресія ДНКаз I у цитоплазмі ацинарних клітин атрофованої частки ПЗ. Непряма імунопероксидазна реакція з підфарбуванням ядер клітин гематоксиліном. ДАБ-реакція. $\times 400$

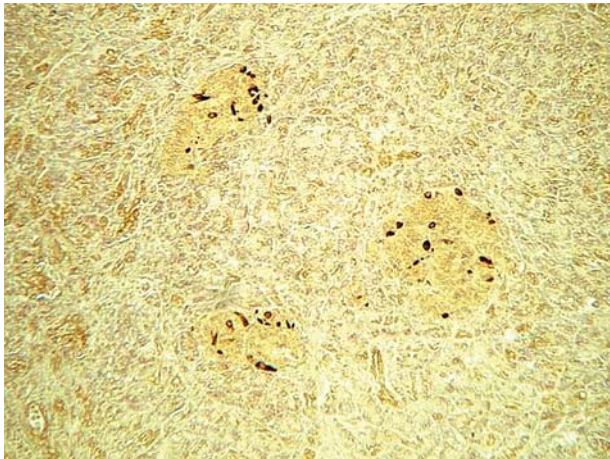


Рис. 9. I стадія фіброзу ПЗ. Зона збереження нормальної структури залози. Ендонуклеаза-G у цитоплазмі частини клітин острівців Лангерганса (виражений сигнал), в цитоплазмі епітеліоцитів проток (слабкий сигнал) Непряма імунопероксидазна реакція з підфарбуванням ядер клітин гематоксиліном, ДАБ-реакція. $\times 100$

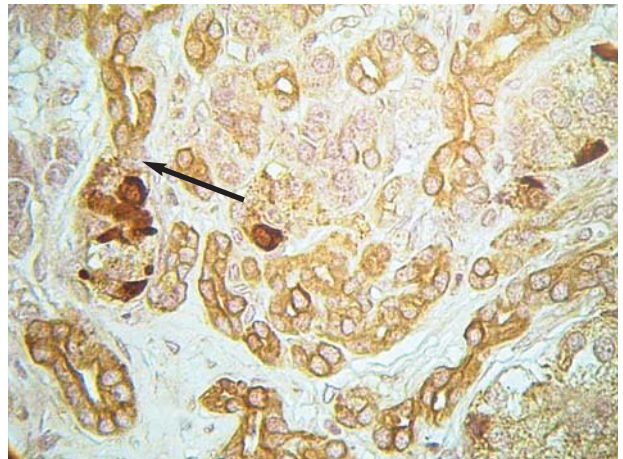


Рис. 10. III стадія фіброзу ПЗ. Експресія ендонуклеази-G в ендокринних клітинах (виражений сигнал) та в протокових клітинах (слабкий сигнал). Тубулярний комплекс (вказано стрілкою). $\times 200$

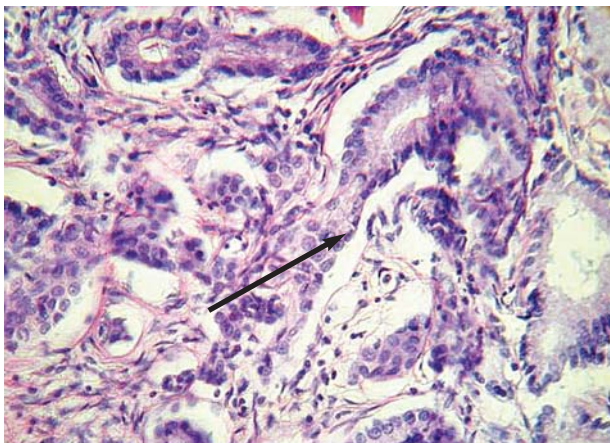


Рис. 11. III стадія фіброзу ПЗ. Тубулярний комплекс (вказано стрілкою). Фарбування гематоксиліном і еозином. $\times 200$

цитоплазмі ацинарних клітин, а ендонуклеаза-G — в частині інсулярних клітин і в епітелії проток, що свідчить про існування різних механізмів апоптозу в екзо- та ендокринній частинах ПЗ. При регенерації ПЗ в умовах ХП, на III та IV стадії фіброзу, в екзокринній частині формуються тубулярні комплекси. Обов'язковим елементом цих комплексів є ендокринні клітини, в цитоплазмі яких експресується ендонуклеаза-G.

Ідентифікація морфологічних і біохімічних маркерів апоптозу в перспективі сприятиме глибшому розумінню механізмів патогенезу захворювань, поліпшенню диференційної діагностики й розробці принципово нових напрямів терапії.

Список літератури

1. Белушкіна Н.Н. Молекулярные основы апоптоза / Н.Н. Белушкіна, Х.А. Хасан, С.Е. Северин // *Вопр. биол. мед. и фарм. химии.*— 1998.— № 4.— С. 15—23.
2. Лушников Е.Ф. Апоптоз клеток: морфология, биологическая роль, механизмы развития / Е.Ф. Лушников, В.М. Загребин // *Архив патологии.*— 1987.— Т. 49.— С. 84—89.
3. Новикова В.С. Программированная клеточная гибель / В.С. Новикова.— СПб: Наука, 1996.— 254 с.
4. Уманский С.Р. Апоптоз: молекулярные и клеточные механизмы / С.Р. Уманский // *Молекулярная биология.*— 1996.— Т. 30, вып. 3.— С. 487—502.
5. Apoptosis and proliferation of acinar and islet cells in chronic pancreatitis: evidence for differential cell loss mediating preservation of islet function / A.C. Bateman, S.M. Turner, K.S.A. Thomas, P.R. McCrudden // *Gut.*— 2002.— Vol. 50.— P. 542—548.
6. The condensation of chromatin in apoptotic thymocytes shows a specific structural change / C. Allera, G. Lazzarini, E. Patrone, I. Alberti // *J. Biol. Chem.*— 1997.— Vol. 272 (16).— P. 10817—10822.
7. Grabarek J. Use of fluorescently labeled caspase inhibitors as affinity labels to detect activated caspases / J. Grabarek, P. Amstad, Z. Darzynkiewicz // *Hum. Cell.*— 2002.— Vol. 15. P. 1—12.
8. Klopell G. Chronic pancreatitis: evolution of the disease / G. Klopell, B. Mailliet // *Hepatogastroenterol.*— 1991.— Vol. 8.— P. 408—412.
9. Robert L. Low mitochondrial endonuclease G function in apoptosis and mtDNA metabolism: a historical perspective / L. Robert // *Mitochondrion.*— 2003.— Vol. 2, N 4.— P. 225—236.
10. Sarles H. Pathogenesis of chronic pancreatitis / H. Sarles, J.P. Bernard, I. Gullo // *Gut.*— 1990.— Vol. 31.— P. 629—632.
11. Stolte M. Chronische Pancreatitis / M. Stolte // *Verh. Dtsch. Ges. Path.*— 1987.— Bd. 71. -S. 175.
12. Wang G.S. Tubular complex as a source for islet neogenesis on the pancreas of diabet-prone BB rats / G.S. Wang, L. Rosenberg, T.W. Scott // *Lab. Invest.*— 2005.— Vol. 85, N 5.— P. 675—688.
13. Wylie A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation / A.H. Wylie // *Nature.*— 1980.— Vol. 284.— P. 555—556.

Е.А. Крылова

Локалізація проапоптичних протеаз ДНКазы I і ендонуклеазы-G в піджелудочній залезі болыных хроніческим панкреатитом

Изучены особенности локализации ДНКазы I и ендонуклеазы-G в цитоплазме клеток поджелудочной железы больных хроническим панкреатитом. Установлено, что при хроническом панкреатите проапоптотические протеазы экспрессируются в цитоплазме клеток разных частей поджелудочной железы: ДНКазы I — в цитоплазме ацинарных клеток, а ендонуклеазы-G — в части инсулярных клеток и в эпителии проток, что свидетельствует о существовании разных механизмов апоптоза в экзо- и эндокринной частях поджелудочной железы.

О.О. Krylova

Localization of pro-apoptotic proteases of DNA-ase I and endonuclease-G in pancreas of patients with chronic pancreatitis

The study has been held to investigate peculiarities of localization of pro-apoptotic proteases of DNA-ase I and endonuclease-G in pancreas cells' cytoplasm. It has been established that at chronic pancreatitis pro-apoptotic proteases are expressed in the cytoplasm of cells in different pancreas parts: DNA-ase I and endonuclease-G were revealed in cytoplasm of acinar cells, and endonuclease-G — in an islet cells and epithelium of ducts, that testifies about the existence of different apoptosis mechanisms in the endo- and exo- parts of pancreas.

Контактна інформація

Крылова Елена Александрівна, к. мед. н., ст. наук. співр., вчений секретар
49074, м. Дніпропетровськ, просп. імені газети «Правда», 96. Тел. (562) 27-59-16. E-mail: lenkr@bk.ru

Стаття надійшла до редакції 4 лютого 2011 р.