

М.В. Борисюк, В.Є. Досенко, Ю.В. Биць

Стан еластолітичної системи підшлункової залози при моделюванні цукрового діабету

При моделюванні стрептозотоцинового і алоксанового сахарного діабету у крыс спостерігається порушення балансу між еластазою та її інгібіторами (α_1 -інгібітор протеїнази, α_2 -макроглобулін, кислототермостабільні інгібітори) в тканинах підшлункової залози. Це проявляється в формі зменшення в тканинах підшлункової залози частки проеластази та збільшення активної форми цієї протеїнази, зменшення вмісту α_1 -інгібітора протеїнази та α_2 -макроглобуліну, зростання питомої ваги кислототермостабільних інгібіторів в тканинах підшлункової залози. Порушення рівноваги в системі еластаза-інгібітори, встановлене при моделюванні сахарного діабету, може призводити до розвитку екзокринної недостаточності підшлункової залози з ознаками панкреатиту при інсулінзалежному сахарному діабеті. Крім того, активація еластолізу в тканинах підшлункової залози при експериментальному сахарному діабеті може мати важливе значення в пошкодженні островців Лангерганса та прогресуванні інсулінової недостаточності.

ВСТУП

Як у теоретичному, так і практичному аспекті великий інтерес викликають взаємовідношення екзокринної та ендокринної функції підшлункової залози як залози зі змішаним типом секреції. Не викликає ніяких сумнівів можливість розвитку вторинного цукрового діабету (ЦД) при запаленні підшлункової залози, але залишається відкритим питання про ушкодження екзокриноцитів у процесі імунозалежного ураження β -клітин острівців Лангерганса у разі ЦД [1, 12, 14, 18].

У клінічних дослідженнях доведено, що вже на початкових стадіях інсулінзалежного ЦД (ІЗЦД) порушується секреторна функція ацинарних клітин підшлункової залози, яка проявляється зниженням загального вмісту панкреатичного соку [8]. При обстеженні дітей, хворих на ІЗЦД, виявлено зниження у калі активності найбільш вагомих ферментів підшлункової залози - трипсину та еластази [14, 18]. Зниження активності трипсину у сироватці крові при цьому вважається показни-

ком розвитку ЦД. Експериментальні дослідження також підтверджують версію про ушкодження екзокринної частини підшлункової залози при ЦД. У щурів із стрептозотоциновим ЦД спостерігається лімфоцитарна інфільтрація екзокринних відділів залози, що дало підставу говорити про розвиток панкреатиту при експериментальному ЦД та, можливо, і при ІЗЦД [13, 20].

У нормі ацинарні клітини виробляють еластазу та інші протеолітичні ферменти у вигляді проферментів. Одночасно у підшлунковій залозі утворюється багато білків із антипротеазними властивостями. Йдеться про так звані кислототермостабільні інгібітори протеїнази (КТСІ), які здатні пригнічувати активність широкого кола протеолітичних ферментів і знайшли своє практичне застосування у вигляді медичних препаратів (контрикал, гордокс тощо) при лікуванні гострого панкреатиту. Крім того, сироваткові інгібітори еластази α_1 -інгібітор протеїнази - α_1 -ІІІ та α_2 -макроглобулін - α_2 -М, які надходять до тканин підшлункової залози із

циркулюючої крові, можуть мати велике значення у підтриманні контролю за активністю еластази в цьому органі [3,5,7]. Зазначені інгібітори порівняно з КТСІ мають значно більшу константу асоціації з еластазою та незворотно пригнічують її активність [9, 11]. Порушення регуляції активності еластази як надзвичайно агресивної протеїнази може призводити до каскадної активації протеолітичних ферментів тканин і крові внаслідок внутрішньопанкреатичної активації проеластази та інших протеїназ, що синтезуються у цьому органі.

Таким чином, метою цієї роботи було комплексне вивчення стану системи еластази – інгібітори еластази на ранніх стадіях експериментального ЦД.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на 45 щурах-самцях лінії Вістар масою $241,6 \text{ г} \pm 5,81 \text{ г}$, яких було поділено на три групи: I - контрольна; II – тварини, яких забивали через 4 тиж після інтраперитонеального введення стрептозотоцину (SZT) (Sigma Aldrich, США) із розрахунку 50 мг/кг в $0,1 \text{ моль/л}$ цитратному буфері (рН 4,5); III- тварини, яких забивали через 4 тиж після інтраперитонеального введення алоксану (Chemapol, Чеська Республіка), 100 мг/кг в $0,1 \text{ моль/л}$ цитратному буфері (рН 4,5) [2]. Під час проведення досліджень тварин усіх груп утримували на стандартній дієті за однакових умов.

Для підтвердження розвитку діабету у щурів фотометрично визначали вміст глюкози у крові із застосуванням тест-наборів “Хромоглюкоза” (“Агат-мед”, Україна), а вміст глюкози у сечі – за допомогою діагностичних смужок “Глюкофан” (“Lachema”, Чеська Республіка).

Після видалення підшлункової залози її негайно занурювали в $0,05 \text{ моль/л}$ тріс-НСІ буфер (рН 7,4) при 4°C . Подрібнені шматочки підшлункової залози гомогенізували в $0,05 \text{ моль/л}$ тріс-НСІ буфері (рН 7,4) з $0,25\%$ -м розчином неіонного детергенту Три-

тон X-100 при 4°C , використовуючи гомогенізатор скло – скло. Гомогенат центрифугували при 6000 хв^{-1} (3500 g) 10 хв, супернатант використовували для подальшого біохімічного аналізу. Активність еластази визначали за гідролізом специфічного хромогенного субстрату $\text{Suc-(Ala)}_3\text{-p-NA}$ та виражали в мікромолях за 1 год в 1 г білка [6]. Активність проеластази в гомогенатах підшлункової залози визначали за приростом активності гідролізу зазначеного хромогенного субстрату після преінкубації проби з 2 нмоль/л трипсину. Останній сприяє перетворенню проеластази в активну еластазу, але не здатний до гідролізу специфічного субстрату. Активність проеластази виражали в тих самих одиницях, як і еластази. Для визначення вмісту $\alpha_2\text{-МГ}$ та $\alpha_1\text{-ІІІ}$ за методом Веремеєнка використовували N-бензоїл-DL-аргінін-p-NA (БАПНА) [4]. Вміст КТСІ визначали за методикою Нартикової у нашій модифікації [9]. Вміст білка в гомогенатах тканин визначали за методом Lowry [15].

Отримані результати обробляли математично на ПК IBM 586 SLC з використанням програм Sigma Plot 5.0, Excel 97. Вірогідність різниці середніх значень визначали за критерієм t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Після введення як стрептозотоцину, так і алоксану у щурів спостерігалися чіткі прояви розвитку ЦД. Через 4 тиж після введення SZT вміст глюкози в крові становив $9,69 \text{ ммоль/л} \pm 0,67 \text{ ммоль/л}$, а в сечі – $66,43 \text{ ммоль/л} \pm 10,03 \text{ ммоль/л}$. Після введення алоксану концентрація глюкози в крові була $8,06 \text{ ммоль/л} \pm 0,19 \text{ ммоль/л}$, а глюкозурія – $12,0 \text{ ммоль/л} \pm 3,93 \text{ ммоль/л}$. Тільки у тварин із алоксановим ЦД у сечі збільшувався вміст кетонів тіл ($1,5 \text{ ммоль/л}$). У дослідних тварин спостерігалися також додаткові ознаки інсулінової недостатності – полідипсія та поліурія.

Стан еластолітичної системи при стрептозотоциновій моделі ЦД. Отримані результати

(таблиця) свідчать про зміни у тварин II групи співвідношення неактивної форми протеолітичного ферменту - проеластази та еластази. Зокрема, вміст проеластази в тканинах підшлункової залози цих тварин був у 2,5 раза меншим, ніж у контролі ($P < 0,05$). Водночас активність еластази у тварин цієї групи збільшувалась і становила $49,54 \text{ мкмоль р-На} \cdot \text{год}^{-1} \cdot \text{г}^{-1} \text{ білка} \pm 8,10 \text{ мкмоль р-На} \cdot \text{год}^{-1} \cdot \text{г}^{-1} \text{ білка}$, що у 1,7 раза більше, ніж у інтактних щурів ($P < 0,05$).

Вміст інгібіторів еластази у підшлунковій залозі тварин також істотно змінювався. Так, концентрація α_2 -М знижувалася на 17,5 % ($P > 0,05$), а α_1 -ІІІ на 47,7 % порівняно з контролем ($P < 0,05$). Вміст КТСІ, навпаки, збільшувався втричі ($0,39 \text{ мг/г білка} \pm 0,04 \text{ мг/г білка}$; в контролі - $0,13 \text{ мг/г білка} \pm 0,02 \text{ мг/г білка}$; $P < 0,05$).

Стан еластолітичної системи при алоксановій моделі ЦД. Через 4 тиж після введення алоксану у підшлунковій залозі щурів також спостерігалися суттєві зміни балансу системи еластаза - інгібітори (див. таблицю). Так, вміст проеластази зменшувався у 6,3 раза порівняно з контролем ($9,84 \pm 2,09, 62,59 \text{ мкмоль р-На} \cdot \text{год}^{-1} \cdot \text{г}^{-1} \text{ білка} \pm 8,37 \text{ мкмоль р-На} \cdot \text{год}^{-1} \cdot \text{г}^{-1} \text{ білка}$ відповідно; $P < 0,001$). Активність еластази порівняно з контролем

збільшувалась у 1,4 раза ($P < 0,05$). У стані системи інгібіторів виявлено не менш істотні зміни. Зокрема, вміст α_2 -М знижувався на 32,9 % ($P > 0,05$), а α_1 -ІІІ на 74% ($P < 0,05$) порівняно з контролем. Вміст КТСІ підвищувався, але не так суттєво, як при стрептозотоциновому діабеті - лише на 13,3% ($P > 0,05$).

Аналізуючи отримані результати, перш за все слід звернути увагу на збільшення активності еластази в тканинах підшлункової залози при використаних експериментальних моделях ЦД. З одного боку, це свідчить про спроможність ацинарних клітин до синтезу еластази, а з іншого, враховуючи, що частка проеластази значно зменшилася, про активацію останньої в підшлунковій залозі. Таким чином, активована еластаза набуває здатності проявляти свої гідролітичні властивості безпосередньо в тканинах підшлункової залози.

Важливим, на нашу думку, є зменшення співвідношення α_1 -ІІІ та КТСІ при експериментальному ЦД. Як після введення стрептозотозину, так і при алоксановій моделі питома вага КТСІ підвищувалася, а внесок α_1 -ІІІ в антиеластазну активність, навпаки, знижувався. При підрахунку інтегрального показника еластолізу – коефіцієнта інгібітори/еластаза було встановлено його зменшення порівняно з контролем як при стрепто-

Активність еластази, вміст α_2 -макроглобуліну та α_1 -інгібітора протеїназ у підшлунковій залозі щурів за умов моделювання цукрового діабету ($M \pm m$; $n=15$)

Показники	Контроль	Через 4 тиж після введення	
		стрептозотозину	алоксану
Вміст проеластази, мкмоль р-НА \cdot год ⁻¹ \cdot г ⁻¹ білка	62,58 \pm 8,37	25,22 \pm 9,90*	9,96 \pm 2,09*
Активність еластази, мкмоль р-НА \cdot год ⁻¹ \cdot г ⁻¹ білка	29,91 \pm 2,17	49,54 \pm 8,10*	42,65 \pm 4,69*
α_2 -макроглобулін, мг/г білка	0,97 \pm 0,33	0,80 \pm 0,09	0,65 \pm 0,05
α_1 -інгібітор протеїназ, мг/г білка	1,51 \pm 0,02	0,79 \pm 0,05*	0,39 \pm 0,10*
Кислототермостабільні інгібітори, мг/г білка	0,13 \pm 0,02	0,39 \pm 0,04*	0,15 \pm 0,02
Інгібітори / еластаза, ум. од.	0,09	0,04	0,03

* $P < 0,05$.

зотоциновому, так і при алоксановому ЦД (0,04, 0,03 відповідно). Збільшення частки КТСІ, на нашу думку, є проявом компенсаторної реакції клітин підшлункової залози у відповідь на значну активацію еластази. Як було зазначено вище, α_1 -ІІІ та α_2 -М порівняно з КТСІ мають більшу константу асоціації з еластазою і тому, незважаючи на збільшення вмісту КТСІ у підшлунковій залозі при цих моделях ЦД, виникає ситуація, коли ацинарні клітини підшлункової залози можуть руйнуватися внаслідок надмірної активації еластази.

Патофізіологічний аналіз порушення балансу між еластазою та її природними інгібіторами в тканинах підшлункової залози при моделюванні ЦД дозволяє припустити, що на його ранніх стадіях складається ситуація, небезпечна як для клітин острівців Лангерганса, так і для ацинарних клітин підшлункової залози. Якщо перші досить специфічно уражуються діабетогенними речовинами, які застосовуються для моделювання ЦД, то в механізмах ушкодження екзокринної частини залози, мабуть, більш важливу роль відіграє надмірна активація еластази та зниження вмісту α_2 -М та α_1 -ІІІ.

У роботах Umans і співавт. було доведено, що нокаут гена α_2 -М у мишей призводить до гострого панкреатиту [19]. При дослідженні деяких цитокінів у підшлунковій залозі було встановлено підвищення активності трансформуючого фактора β , факторів некрозу пухлин α та β , β -лімфотоксину та γ -інтерферону. Доведено, що більшість з них може взаємодіяти з α_2 -М за допомогою зв'язування з певними ділянками цього кур'єра факторів росту [5,10,16]. У разі активації молекули α_2 -М протеїназами (еластазою в нашому випадку), зазначені цитокіни вилучаються з позаклітинного матриксу та втрачають біологічну активність. Розвиток гострого панкреатиту, що спостерігається у дифіцитних за α_2 -М мишей, пояснюється, в першу чергу, дією надлишку цитокінів на екзокриноцити, а не зменшенням антипротеазного потенціалу в тканинах підшлункової залози

[19]. Зменшення вмісту α_2 -М, як було встановлено в наших дослідях, також може сприяти реалізації цитотоксичної дії зазначених цитокінів.

Інший антиеластазний протеїн - α_1 -ІІІ, який виділяється макрофагами в осередку запалення, здатний захищати тканини від протеолітичної деградації [17]. При взаємодії протеїназ з цим інгібітором розщеплюється певний сайт його молекули, що призводить до вивільнення карбокситермінального фрагмента з молекулярною масою 4 кДа. Виявилося, що він має біологічну активність і, зокрема, може стимулювати продукцію цитокінів моноцитами та експресію рецепторів α_2 -М на поверхні печінкових клітин у культурі. Таким чином, крім безпосередньої антипротеїназної дії, α_1 -ІІІ та побічні продукти його взаємодії з протеїназами здатні впливати на перебіг запального процесу. Наскільки важливим є цей механізм у запаленні, що відбувається в підшлунковій залозі при панкреатиті та інсулініті, невідомо.

ВИСНОВКИ

1. При моделюванні стрептозотоцинового та алоксанового експериментального ЦД у підшлунковій залозі дослідних тварин спостерігаються однонаправлені зміни в системі еластаза - інгібітори, а саме: зменшення вмісту проеластази та збільшення активної форми цієї протеїнази у тканинах підшлункової залози; зменшення вмісту інгібіторів еластази, які мають більшу константу асоціації з еластазою - α_2 -М та α_1 -ІІІ; збільшення питомої ваги КТСІ при зменшенні частки α_1 -ІІІ у загальній антитриптичній активності тканин підшлункової залози; порушення співвідношення інгібітори/еластаза (інтегрального показника еластолізу) у бік збільшення активності протеолізу.

2. Порушення активності еластази та її інгібіторів у тканинах підшлункової залози може призводити до ураження її екзокринної частини і складає важливу ланку в патогенезі панкреатиту при ЦД.

3. Активація еластолізу у тканинах підшлункової залози при експериментальному

ЦД може відігравати додаткову роль в ураженні острівців Лангерганса та прогресуванні інсулінової недостатності.

M.V. Borysyuk, V.Ye. Dosenko, Yu.V. Byts

ELASTOLITIC SYSTEM OF PANCREAS AT MODELLING DIABETES MELITUS

At modelling streptozotocin and alloxan diabetes melitus in rats we have detected an imbalance between elastase and its inhibitors (alpha 1 inhibitor of protein kinases, alpha-2 macroglobulin, acid-thermoreistant inhibitors) in tissues of the pancreas. The contribution of proelastase decreased but that of an active form of protein kinase increased; the content of alpha 1 inhibitor of protein kinase and alpha 2 macroglobulin reduced, however the contribution of the acid-thermoreistant inhibitors in the pancreatic tissues increased. Imbalance in the system elastase- inhibitors, shown at the model of diabetes mellitus, may be an important mechanism of an exocrine unsufficiency of the pancreas which results in pancreatitis.

A.A.Bogomoletz Medical University, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Балаболкин М.И. Эндокринология. – М.: Медицина, 1998.–400 с.
2. Баранов В.Г. Экспериментальный сахарный диабет. – Л.:Наука, 1983.–240 с.
3. Биць Ю.В., Досенко В.Є. Роль еластази в патогенезі артеріосклерозу // Пробл. медицини.– 1999.–№5.–С.10–17.
4. Веремеенко К.Н. Голобородько О.П., Кизим А.Й. Протеолиз в норме и при патологии. – К.: Здоров'я, 1988.–200с.
5. Веремеенко К.М., Кізім А.Й., Досенко В.Є. Альфа2-макроглобулін: структура, фізіологічна роль і клінічне значення // Лаб. діагностика.–2000.–№2.–С.3–8.
6. Веремеенко К.Н., Кизим А.И., Терентьев А.Г. Определение активности эластазы и ее ингибиторов в сыворотке крови с помощью хромогенных субстратов // Клини. лаб. диагностика.–1992.–№5–6.–С.58–61.
7. Логинов А.С. Ингибиторы протеаз в поджелудочной железе и сыворотке крови: физиологическая роль // Физиол.журн.–1982.–28, №5. – С.692–698.
8. Морозова Н.Н. Внешнесекреторная функция поджелудочной железы при начальных формах сахарного диабета // Клини. медицина. – 1980.–58, №6. – С.68–75.
9. Нартикова В.Ф. Термо-кислотостабильный ингибитор трипсина из сыворотки крови кролика: выделение, очистка и свойства: Автореф. дис. ... канд.биол.наук.– М., 1970.–27 с.
10. Системная энзимотерапия. Теоретические основы, опыт клинического применения /Под ред. К.Н.Веремеенко. – К.: Морион, 2000. – 320с.
11. Bernstein P.R., Edwards P.D., Williams J.C. Inhibitors of human leukocyte elastase [Review] // Progress. Med. Chem.– 1994.– 31.– P. 59–120.
12. Kato M., Hayakawa S., Naruse S. et al. Plasma alpha 2-macroglobulin-trypsin complex like substance (MTLS) in pancreatic disease //J. Clin. Lab. Anal. –1996.–10, №6.–P.399–402.
13. Li Z., Zhao L., Sandler S. et al. Expression of pancreatic islet MHC class I, insulin, and ICA 512 tyrosine phosphatase in low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice // J. Histochem. Cytochem.–2000.–48, №.67.–P.761–767.
14. Lorini R., Cortona L., Scotta M.S. et al. Exocrine pancreatic function in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus // Diabetes. Res. Clin. Pract.–1990.–8, № 3. – P.263–267.
15. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. et al. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.–1951.–193.–P.265–275.
16. Lysiak J.J., Hussaini I.M., Webb D.J. et al. Alpha 2-macroglobulin function as a cytokine carrier to induce nitric oxide syntesis and cause nitric oxide-dependent cytotoxicity in the RAW 264.7 macrophage cell line // J. Biol. Chem.– 1995.– 270, № 37.– P. 21919–21927.
17. Mashiba S., Wada Y., Mayama H. et al. In vivo complex formation of oxidized a1-antitrypsin and LDL // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.– 2001.– 21, №11.–P.1801–1809.
18. Sato M, Yamamoto K, Mayama H. et al. Exocrine pancreatic function in diabetic children // J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.–1984.–3, № 3.– P.415–420.
19. Umans L, Serneels L, Stas L. et al. Alpha2-macrodlobulin and murinodlobulin-1-deficient mice. A mouse model for acute pancreatitis // Pancreas.– 1998.–17, № 3.– P.289–294.
20. Wood S.C., Rao T.D., Frey A.B. Multidose streptozotocin induction of diabetes in BALB/c mice induces a T cell proliferation defect in thymocytes which is reversible by interleukin-4 // Cell. Immunol.–1999.–192, № 1.–P.1–12.

Нац.мед. ун-т ім. О.О.Богомольця

Матеріал надійшов до редакції 16.05.2002