

*Anna Andrzejewska¹, Jan W. Długosz²

Udział mikroskopii elektronowej w badaniach nad patogenezą ostrego zapalenia trzustki

The significance of electron microscopy in elucidation of pathogenesis of acute pancreatitis

¹Zakład Patomorfologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Kierownik Zakładu: prof. dr hab. med. Lech Chyczewski

²Klinika Gastroenterologii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Andrzej Dąbrowski

Streszczenie

Ogólnie przyjmuje się, że ostre zapalenie trzustki (OZT) jest chorobą, w której trzustka ulega uszkodzeniu przez własne enzymy trawienne. Mechanizmy odpowiedzialne za wewnątrzkomórkową aktywację enzymów nie są do końca wyjaśnione. W pracy dokonano przeglądu badań ultrastrukturalnych, które były najbardziej istotne w badaniach nad patogenezą OZT. Przedstawiono ultrastrukturalne dowody na potwierdzenie najważniejszych hipotez patogenetycznych: kolokalizacji i autofagii. Podkreślono rolę badań ultrastrukturalnych w powiązaniu zaburzeń w mikrokrażeniu trzustkowym z nasileniem choroby, jak również w potwierdzeniu roli rodników tlenowych w patogenezie OZT.

Słowa kluczowe: ostre zapalenie trzustki, patogenezę, ultrastruktura

Summary

Acute pancreatitis is generally believed to be a disease in which the pancreas is injured by digestive enzymes that it normally produces. The mechanisms responsible for intracellular activation of digestive enzyme zymogens have not been elucidated with certainty. This paper reviews the ultrastructural changes in acinar pancreatic cells which have been the most significant in elucidation of pathogenesis of acute pancreatitis. This review focuses on the ultrastructural evidences supporting the validity of the main pathogenetic hypotheses: co-localization and autophagy. The paper emphasizes the role of ultrastructural studies in the connection of pancreatic microcirculation disturbances with severity of disease and the importance of oxygen radicals in the pathogenesis of acute pancreatitis.

Key words: acute pancreatitis, pathogenesis, ultrastructure

Ostre zapalenie trzustki (OZT) wg koncepcji przyjętej przez wielu badaczy jest chorobą z samotrawienia charakteryzującą się proteolityczną destrukcją mięszu, martwicą ścian naczyń krwionośnych prowadzącą do krwotoków, martwicą tkanki tłuszczowej oraz odczynem zapalnym. Powszechnie przyjmuje się, że kluczowym mechanizmem w patogenezie OZT jest przedwczesna aktywacja trypsynogenu, która zapoczątkowuje sekwencję zdarzeń prowadzących do wewnątrzkomórkowej aktywacji enzymów trzustkowych. Fizjologicznie trawienne enzymy trzustkowe zawarte w ziarnistościach zymogenu są odseparowane od enzymów lizosomalnych „zamkniętych” w lizosomach. W warunkach prawidłowych niektóre z enzymów trawiennych, np. amylaza, lipaza, DNAaza, RNAaza są

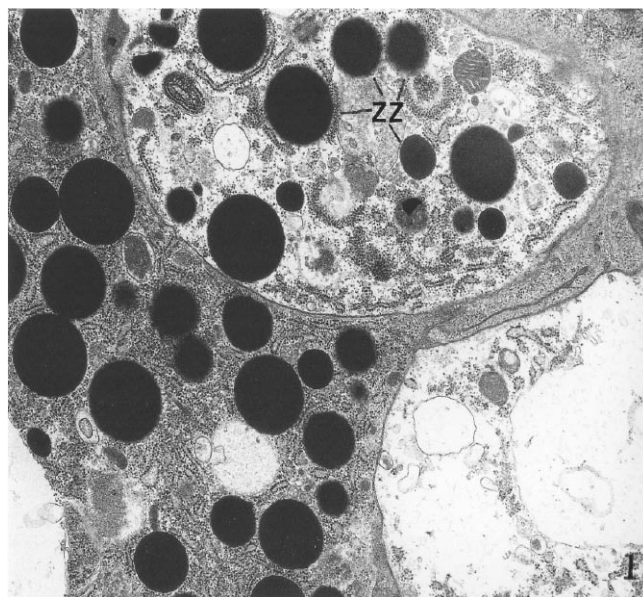
wydzielane przez komórki trzustkowe w formie aktywnej, ale inne, potencjalnie niebezpieczne, np. trypsyna, chymotrypsyna, fosfolipaza, elastaza, karboksypeptydaza są syntetyzowane jako nieaktywne proenzymy, których aktywacja zachodzi dopiero po ich przejściu do dwunastnicy, gdzie enterokinaza aktywuje trypsynogen do trypsyny, która z kolei katalizuje aktywację innych proenzymów.

Tak więc zasadniczym problemem stało się wyjaśnienie, jakie zmiany zachodzą w komórkach trzustkowych we wczesnych okresach OZT, które doprowadzają do wewnątrzkomórkowej aktywacji enzymów. Było to impulsem do przeprowadzenia wielu badań nie tylko biochemicznych i czynnościowych, ale również morfologicznych, w tym ultrastrukturalnych

przy użyciu eksperymentalnych modeli OZT. Jedną z ważniejszych hipotez jest tzw. hipoteza kolokalizacji (*co-localization hypothesis*) (1). Punktem wyjścia do jej powstania były głównie badania ultrastrukturalne. Przy użyciu techniki *freeze fracture* i mikroskopii elektronowej wykazano, że najwcześniejsze zmiany ultrastrukturalne w doświadczalnym obrzękowym ceruleinowym OZT dotyczą błon ziarnistości zymogenu i błon plazmatycznych komórek pęcherzykowych trzustki (2). Stwierdzono, że blokada egzocytozy ziarnistości zymogenu, upośledzenie dojrzewania wakuoli zagęszczających (normalnie proces ten prowadzi do segregacji enzymów trawiennych i lizosomalnych) oraz zlewianie się ziarnistości zymogenu prowadziło do formowania dużych, ograniczonych błonami wakuoli wewnątrzcytoplazmatycznych, które we wszystkich stadiach swego rozwoju zawierały enzymy trawienne i lizosomalne (2, 3, 4, 5, 6, 7). Ta współlokalizacja jest istotna w rozwoju OZT ponieważ enzymy lizosomalne, takie jak np. katepsyna B są zdolne do aktywowania trypsynogenu i wyzwalania kaskady enzymów trzustkowych (8, 9). Badania ultrastrukturalne z immunolokalizacją wykazały, że aktywacja trypsynogenu ma miejsce w wakuolach cytoplazmatycznych, a powstała trypsyna jest uwalniana do cytosolu (10, 11). Rolę katepsyny B w wewnątrzkomórkowej aktywacji trypsynogenu potwierdziły ostatecznie badania Halangka i wsp. (12), którzy stwierdzili, że u myszy pozbawionych genu katepsyny *ctsb gen* (-) aktywność trypsyny w trzustce w indukowanym ceruleiną OZT była o ponad 80% niższa niż u zwierząt *ctsb gen* (+), a badania ultrastrukturalne wykazały mniejsze uszkodzenie komórek pęcherzykowych. Badania Van Acker i wsp. (13) potwierdziły, że aktywacja trypsynogenu oraz zwiększenie kruchości struktur subkomórkowych są zależne od aktywności katepsyny B. Nowe badania ultrastrukturalne połączone z immunobarwieniem w mikroskopie elektronowym wykazały uszkodzenie błon komórkowych komórek pęcherzykowych w ceruleinowym i taururocholanowym OZT co prowadziło do napływu wapnia oraz penetracji albumin i IgG do cytoplazmy (14).

Ostatnio Hashimoto i wsp. (15) zaproponowali teorię autofagii dla aktywacji trypsynogenu w OZT. Badacze ci wykonali niezwykle interesujące badania z użyciem mikroskopu elektronowego i oznaczania ekspresji *microtubule-associated protein 1 light chain 3* w OZT nad rolą zjawiska autofagocytozy w aktywacji trypsynogenu w komórkach pęcherzykowych trzustki – przy pomocy tych technik wykazali, że cytoplazmatyczne wakuole powstające w komórkach pęcherzykowych w indukowanym cholecystokiną OZT mają charakter wakuoli autofagowych. W celu przeanalizowania roli makroautofagii w OZT użyli myszy pozbawionych genu autofagii (*autophagy-related 5 gen*) w komórkach pęcherzykowych trzustki. Okazało się, że u zwierząt tych nie rozwinęło się OZT, a tylko niewielki, ograniczony obrzęk, a aktywacja trypsynogenu była znacznie zredukowana. Wyniki te sugerują, że proces autofagocytozy zwiększa dewastację komórek pęcherzykowych przez aktywację trypsynogenu do trypsyny we

wczesnych stadiach OZT. Również najnowsze badania potwierdzają kluczowe znaczenie autofagocytozy OZT (16). W naszych pracach w przebiegu OZT indukowanego ceruleiną (17, 18, 19) w większości komórek pęcherzykowych trzustki obserwowaliśmy liczne, różnej wielkości wakuole – niektóre z nich zawierały łatwe do identyfikacji organelle komórkowe, takie jak częściowo zdegradowane ziarnistości zymogenu, fragmenty szorstkiej sieci śródplazmatycznej, mitochondria, w innych obserwowaliśmy tylko amorficzną zawartość i/lub błoniaste struktury (ryc. 1). Podobne, aczkolwiek bardziej nasilone zmiany stwierdziliśmy w martwiczo-krwotocznym taururocholanowym OZT (20, 21). Obraz ten odpowiada tzw. makroautofagii, którą definiuje się jako sekwestrację części cytoplazmy obejmującą nie tylko rozpuszczalne białka, ale także organelle komórkowe do tzw. autofagosomów. Przez połączenie się z lizosomami autofagosomy stają się autolizosomami zawierającymi enzymy hydrolityczne, które nie tylko degradują sekwestrowany materiał, ale również hydrolizują trypsynogen do trypsyny (katepsyna B) (15, 22, 23). W naszych badaniach aktywacja trypsynogenu była 3-4-krotnie wyższa u zwierząt z OZT niż w grupie kontrolnej (17, 18, 20).



Ryc. 1. Fragment komórki pęcherzykowej z wakuolami autofagowymi – jedna z nich zawiera ziarnistości zymogenu (ZZ), fragmenty sieci śródplazmatycznej, mitochondrium. Pow. x 7000. Ceruleinowe OZT. Badania własne.

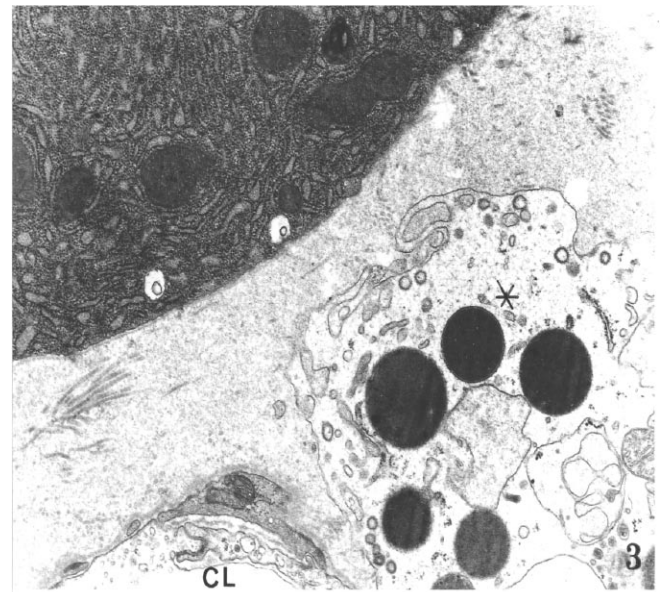
Jungerman i wsp. (24) stwierdzili, postępując się badaniami ultrastrukturalnymi z użyciem p/ciał przeciw aktynie i beta-tubulinie, postępującą degradacją tych białek strukturalnych w obrębie mikrotubul i mikrofilamentów – zdaniem tych badaczy jest to najwcześniejsza morfologiczna zmiana w ceruleinowym OZT, która może prowadzić do zaburzeń w segregacji, transporcie i wydalaniu enzymów trawiennych. Za zjawisko to mogą być m.in. odpowiedzialne wolne rodniki tlenowe, którym przypisuje się istotną rolę w inicjacji i rozwoju

OZT (25, 26, 27, 28, 29). Zastosowanie w przebiegu doświadczonego OZT antyoksydantów, np. tauryny (30), melatoniny (31) czy allopurinolu (32) w sposób istotny poprawiało stan organelli komórkowych w badaniu w mikroskopie elektronowym. Z przytoczonych przykładów wynika, że ocena ultrastrukturalna wniosła istotny wkład do potwierdzenia roli rodników tlenowych w patogenezie OZT.

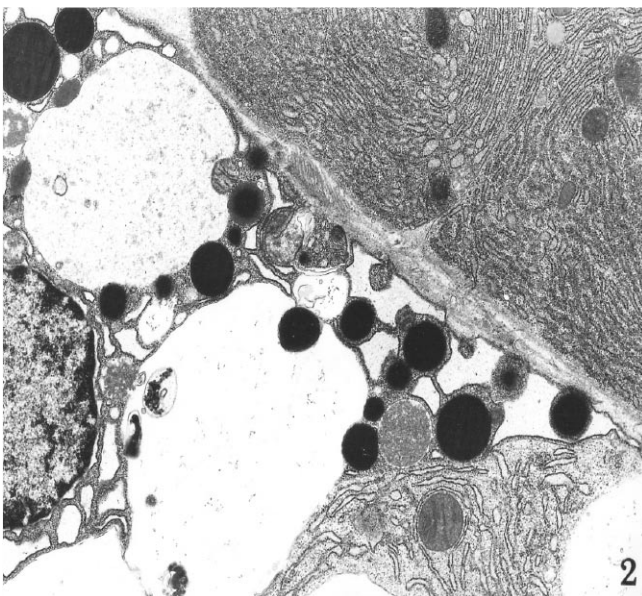
Dzięki badaniom ultrastrukturalnym stwierdzono, że powstające w przebiegu stymulacji ceruleiną wakuole wewnątrzcytoplazmatyczne zlewają się z boczną bądź podstawną, zamiast szczytową, częścią błony plazmatycznej (ryc. 2), wydalając swoją zawartość do przestrzeni śródmiąższowej, co z kolei prowadzi do narastania obrzęku (2, 33, 34). W przestrzeni śródmiąższowej znajdowały się czasem fragmenty zniszczonych komórek pęcherzykowych z ziarnistościami zymogenu (ryc. 3). Tak więc uczynnione enzymy znajdujące się w tkance śródmiąższowej gruczołu, jak również obserwowane w mikroskopie elektronowym „wyrzucanie” ziarnistości zymogenu do tkanki śródmiąższowej mogą prowadzić do uwalniania czynników wazoaktywnych i zaburzeń w mikrokrążeniu trzustkowym, które jest uważane za istotny czynnik w patogenezie OZT (35, 36).

Badania ultrastrukturalne przyczyniły się w znacznym stopniu do powiązania zaburzeń w mikrokrążeniu trzustkowym a rozwojem OZT. Upośledzenie mikrokrążenia we wczesnych stadiach OZT może odgrywać istotną rolę w progresji zmian obrzękowych do zmian krwotocznych i/lub martwiczych. Takano i wsp. (33) stwierdzili, że połączenie ceruleinowego OZT ze stresem prowadziło do stwierdzanej ultrastrukturalnie destrukcji komórek śródbłonka oraz zakrzepicy we włóscinkach – głównie z tymi zmianami strukturalnymi w obrębie układu włóscinkowego autorzy wiązali przejście OZT obrzękowego w krwotoczne. Brackett i wsp. (37) zwrócili uwagę na obrzęk komórek śródbłon-

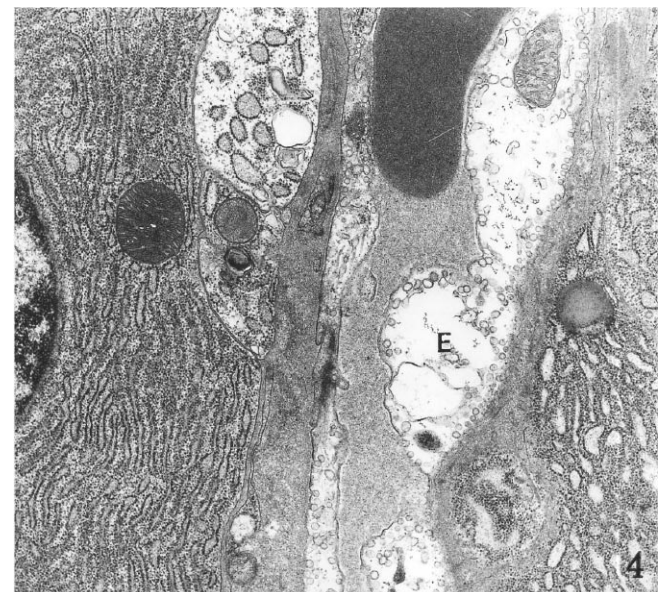
ka z formowaniem elektronowo przeziernych, wpuklających się do światła naczyń bąbli (*blebs*), odcinkową dezintegrację naczyniowych błon podstawnych, jak również uszkodzenie mitochondriów zarówno w komórkach śródbłonka, jak i mięśni gładkich błony środkowej tętniczek w OZT indukowanym zamknięciem pętli dwunastnicy (*the closed duodenal loop technique*). Również nasze badania ultrastrukturalne wykazały zależność między nasileniem zmian zapalnych a stanem naczyń w trzustce. Zarówno w ceruleinowym, jak i martwiczo-krwotocznym OZT często stwierdzaliśmy znaczny obrzęk (ryc. 4), a czasem całkowitą destrukcję komórek śródbłonka, sporadyczne pęknięcie naczyń krwionośnych, a także obecność skupisk płytek krwi i granulocytów w świetle naczyń.



Ryc. 3. Fragment uszkodzonej komórki pęcherzykowej z ziarnistościami zymogenu w obrębie obrzękniętej przestrzeni śródmiąższowej (*). CL – światło naczynia krwionośnego. Pow. x 7000. Ceruleinowe OZT. Badania własne.



Ryc. 2. Wakuole wewnątrzcytoplazmatyczne zlewające się z podstawną częścią błony komórki pęcherzykowej. Pow. x 4400. Ceruleinowe OZT. Badania własne.



Ryc. 4. Znaczny obrzęk komórek śródbłonka (E). AC – komórka pęcherzykowa. Pow. x 7000. Ceruleinowe OZT. Badania własne.

Zmiany w układzie naczyniowym były zdecydowanie mniej wyrażone w obrzękowej postaci OZT.¹

Reasumując, można stwierdzić, że badanie techniką mikroskopii elektronowej zmian zachodzących na poziomie subkomórkowym w przebiegu ostrego zapalenia trzustki istotnie przyczyniło się do wyjaśnienia patogenezy tego schorzenia. Szczególnie ważny, jeśli nie decydujący, wydaje się udział badań ultrastrukturalnych w wiodących hipotezach kolokalizacji i autofagii. Często zjawiska obserwowane w mikroskopie elektronowym w przebiegu OZT w komórkach pęcherzykowych trzustki inicjowały badania czynnościowe i biochemiczne zmierzające do wyjaśnienia skomplikowanych procesów zachodzących w trzustce w przebiegu zapalenia, a przez to przyczyniły się do poszukiwania jak najlepszych metod terapeutycznych.

¹Endnotes

PIŚMIENNICTWO

1. Van Acker GJD, Perides G, Steer ML: Co-localization hypothesis: A mechanism for the intrapancreatic activation of digestive enzymes during the early phases of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1985-1990.
2. Kern HF, Adler G, Scheele GA: Structural and biochemical characterization of maximal and supramaximal hormonal stimulation of rat exocrine pancreas. *Scand J Gastroenterol suppl.* 1985; 112: 20-29.
3. Saito I, Hashimoto S, Saluja A et al.: Intracellular transport of pancreatic zymogens during caerulein supramaximal stimulation. *Am J Physiol* 1987; 253: G517-526.
4. Watanabe O, Baccino FM, Steer ML et al.: Supramaximal caerulein stimulation and ultrastructure of rat pancreatic acinar cell: early morphological changes during development of experimental pancreatitis. *Am J Physiol* 1984; 246: G457-467.
5. Saluja A, Hashimoto S, Saluja M et al.: Subcellular redistribution of lysosomal enzymes during caerulein-induced pancreatitis. *Am J Physiol* 1987; 253: G508-516.
6. Saluja A, Saito I, Saluja M et al.: In vivo rat pancreatic acinar cell function during supramaximal stimulation with caerulein. *Am J Physiol* 1985; 249: G702-710.
7. Grönroos JM, Aho HJ, Hietaranta AJ et al.: Early acinar cell changes in caerulein-induced interstitial acute pancreatitis in the rat. *Exp Pathol* 1991; 41: 21-30.
8. Greenbaum LA, Hirshkowitz A: Endogenous cathepsin activates trypsinogen in extracts of dog pancreas. *Proc Soc Exp Biol Med* 1961; 107: 74-76.
9. Steer ML, Meldolesi J: Pathogenesis of acute pancreatitis. *Ann Rev Med* 1988; 39: 95-105.
10. Hofbauer B, Saluja AK, Lerch MM et al.: Intra-acinar cell activation of trypsinogen during caerulein-induced pancreatitis in rats. *Am J Physiol* 1998; 275: G352-362.
11. Sherwood MW, Prior IA, Voronina SG et al.: Activation of trypsinogen in large endocytic vacuoles of pancreatic acinar cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 5674-5679.
12. Halangk W, Lerch MM, Brandt-Nedele B et al.: Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *J Clin Invest* 2000; 106: 773-781.
13. Van Acker GJ, Weiss E, Steer ML et al.: Cause-effect relationships between zymogen activation and other early events in secretagogue-induced acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G1738-1746.
14. Müller MW, McNeil PL, Büchler P et al.: Acinar cell membrane disruption is an early event in experimental pancreatitis in rats. *Pancreas* 2007; 35: e30-40.
15. Hashimoto D, Ohmuraya M, Hirota M et al.: Involvement of autophagy in trypsinogen activation within the pancreatic acinar cells. *J Cell Biol* 2008; 181: 1065-1072.
16. Gukovsky I, Gukovskaya AS: Impaired autophagy underlies key pathological responses of acute pancreatitis. *Autophagy* 2010; 6: 428-429.
17. Andrzejewska A, Długosz JW, Augustynowicz A: Effect of endothelin-1 receptor antagonists on histological and ultrastructural changes in the pancreas and trypsinogen activation in the early course of caerulein-induced acute pancreatitis in rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1115-1121.
18. Andrzejewska A, Długosz JW: Differential effects of endothelins on histological and ultrastructural changes and trypsinogen activation in the secretagogue-induced acute pancreatitis in rats. *Exp Toxic Pathol* 2010; Epub ahead of print.
19. Andrzejewska A, Jurkowska G: Nitric oxide protects the ultrastructure of pancreatic acinar cells in the course of caerulein-induced acute pancreatitis. *Int J Exp Path* 1999; 80: 317-324.
20. Andrzejewska A, Długosz JW: The endothelin-1 receptor antagonists ameliorate histology and ultrastructural alterations in the pancreas and decrease trypsinogen activation in severe taurocholate pancreatitis in rats. *Int J Exp Path* 2003; 84: 221-229.
21. Długosz JW, Andrzejewska A, Wróblewski E et al.: Beneficial effect of iloprost on the course of acute taurocholate pancreatitis in rats and its limitation by antecedent acute ethanol intake. *Exp Toxic Pathol* 2003; 55: 401-409.
22. Cuervo AM: Autophagy: Many paths to the same end. *Mol Cell Biochem* 2004; 263:55-72.
23. Dunn WA: Studies of the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol* 1990; 110: 1935-1945.
24. Jungermann J, Lerch MM, Weidenbach H et al.: Disassembly of rat pancreatic acinar cell cytoskeleton during supramaximal secretagogue stimulation. *Am J Physiol* 1995; 268: G328-338.
25. Sweiry JH, Mann GE: Role of oxidative stress in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol suppl.* 1996; 219: 10-15.
26. Schoenberg MH, Büchler M, Beger HG: Oxygen radicals in experimental acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 1994; 41: 313-319.
27. Schoenberg MH, Birk D, Beger HG: Oxidative stress in acute and chronic pancreatitis. *Am J Clin Nutr* 1995; 62: 1306S-1314S.
28. Schulz HU, Niederau C, Klonowski-Stumpe H et al.: Oxidative stress in acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 2736-2750.
29. Dąbrowski A, Konturek SJ, Konturek JW et al.: Role oxidative stress in pathogenesis of caerulein-induced acute pancreatitis. *Eur J Pharmacol* 1999; 377: 1-11.
30. Ates Y, Mas MR, Mas N et al.: Acinar cell ultrastructure after taurine treatment in rat acute necrotizing pancreatitis. *Saudi Med J* 2006; 27: 446-452.
31. Eşrefoğlu M, Gül M, Ateş B et al.: Ultrastructural clues for the protective effect of melatonin against oxidative damage in cerulein-induced pancreatitis. *J Pineal Res* 2006; 40: 92-97.
32. Brunelli A, Scutti G: An ultrastructural study to investigate the effect of allopurinol on cerulein-induced damage to pancreatic acinar cells in rat. *Int J Pancreatol* 1998; 23: 25-29.
33. Takano S, Kimura T, Kawabuchi M et al.: Ultrastructural study of the effects of stress on the pancreas in rats. *Pancreas* 1994; 9: 249-257.

34. Scheele G, Adler G, Kern H: Exocytosis occurs at the lateral plasma membrane of pancreatic acinar cell during supramaximal secretagogue stimulation. *Gastroenterology* 1987; 92: 345-353.
35. Sweiry JH, Mann GE: Pancreatic microvascular permeability in caerulein-induced acute pancreatitis. *Am J Physiol* 1991; 261: G685-G692.
36. Kelly D, Delaney C, McEntee G et al.: Correlation of ultrastructural acinar cell changes in cerulein pancreatitis with local microvascular abnormalities. *B J* 1989; 30: A472.
37. Brackett KA, Crockett A, Joffe SN: Ultrastructure of early development of acute pancreatitis in the rat. *Dig Dis Sci* 1983; 28: 74-84.

otrzymano/received: 10.01.2011
zaakceptowano/accepted: 22.02.2011

Adres/address:
*Anna Andrzejewska
Zakład Patomorfologii Lekarskiej
UM w Białymstoku
ul. Waszygtona 13, 15-269 Białystok
tel.: (85) 748-59-15
e-mail: anna.andrzejewska@poczta.fm