УДК 616.37-002:611.37

DOI: 10.22141/1997-2938.2.33.2017.107645

Воробей А.В., Шулейко А.Ч., Владимирская Т.Э., Швед И.А.,
Вижинис Е.И., Орловский Ю.Н., Макки М.Ю.

Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск, Республика Беларусь

Взаимосвязь фиброза и гипоксии поджелудочной железы в патогенезе хронического панкреатита

Резюме. Актуальность. Патогенез хронического панкреатита и болевого синдрома до конца не изучен.

Цель исследования: оценить взаимосвязь фиброзных изменений паренхимы поджелудочной железы, ее гипоксии и панкреатической протоковой гипертензии в патогенезе хронического панкреатита. **Материалы и методы.** В проспективном исследовании проведено морфологическое, иммуногистохимическое изучение препаратов поджелудочной железы, интраоперационно изучены показатели тканевой оксиметрии и панкреатического протокового давления у 40 пациентов, оперированных по поводу хронического панкреатита. **Результаты.** Установлено, что по мере прогрессирования фиброзных изменений в ткани поджелудочной железы пациентов с хроническим панкреатитом отмечается увеличение экспрессии трансформирующего фактора роста β , ($p < 0,001$), количества панкреатических звездчатых клеток ($r = 0,32$; $p < 0,05$), снижение содержания гликогена (маркер гипоксии). При интраоперационном прямом измерении отмечены высокие показатели внутрипротокового давления (34,2 (26,6; 45,3) мм рт.ст.), снижение оксигенации ткани поджелудочной железы, которые коррелируют со степенью фиброза. **Выводы.** Ткани поджелудочной железы при хроническом панкреатите испытывают хроническую гипоксию, связанную с фиброзом и панкреатической протоковой гипертензией. В свою очередь, вторичная ишемия поджелудочной железы может быть значимым фактором в прогрессировании фиброза и хронического болевого синдрома при хроническом панкреатите.

Ключевые слова: хронический панкреатит; фиброз поджелудочной железы; гипоксия поджелудочной железы; панкреатическое протоковое давление; звездчатые клетки

Введение

Хронический панкреатит (ХП) является прогрессирующим воспалительным заболеванием, при котором панкреатическая секреторная паренхима разрушается и замещается фиброзной тканью, что приводит к экзо- и эндокринной недостаточности. Злоупотребление алкоголем [1–3] и курение [4] являются основными причинами развития ХП. Однако только у 10 % алкоголиков развивается ХП. В развитии алкогольного ХП есть дополнительные, возможно генетические, факторы (мутации гена трансмембранного регулятора муковисцидоза) [5].

Существует несколько теорий патогенеза алкогольного хронического панкреатита. Sarles и др. [6–8]

предположили, что хроническое потребление этанола повышает концентрацию белка литостатина в секрете поджелудочной железы (ПЖ) с последующим осаждением белковых пробок в протоках и кальцификацией. Образование камней, в свою очередь, приводит к обструкции протоков, атрофии ацинарной ткани, фиброзу и перидуктальному воспалению дистальнее обструкции.

Токсико-метаболическая гипотеза, выдвинутая Bordalo и Noronha [9], предполагает, что хроническое потребление алкоголя оказывает прямой токсический и метаболический эффект на ацинарные клетки, вызывая прогрессивное отложение липидов, атрофию ацинусов и интрапанкреатический фиброз. Описан-

ные изменения ПЖ, в частности жировая дистрофия ацинарных клеток, не были подтверждены другими исследователями. Согласно гипотезе окислительного стресса, последний создает в ацинарных клетках ПЖ избыточные свободные радикалы, которые вызывают блокаду клеточных ферментов и окисление мембранных липидов [10].

В последние годы ведущей является концепция последовательности некроза и фиброза [11, 12]. Эта теория постулирует, что алкогольный ХП инициируется рецидивирующим тяжелым острым панкреатитом [13]. Резорбция больших площадей жирового и геморрагического некроза, которые являются главными событиями при тяжелом панкреатите, индуцирует фиброз [14, 15] в основном в междольковом пространстве [16, 17]. Междольковый фиброз, в свою очередь, влияет на структуру интерлобулярных протоков, постепенно приводя к их дилатации и стриктурам [18]. В этих измененных протоках нарушается пассаж панкреатического секрета, что может вызвать самопроизвольное выпадение белка с последующей его кальцификацией. В конечном итоге нарушение функции панкреатической секреции приводит к фиброзной трансформации ацинарных клеток и внутридольковому фиброзу.

Патоморфологической особенностью ХП является развитие фиброза ПЖ, в основе которого лежит накопление коллагена и других протеинов внеклеточного матрикса, продуцируемых активированными панкреатическими звездчатыми клетками (ПЗК). Впервые эти клетки описаны Karl von Kupffer в 1876 г., обнаружены в 1980-х годах [19–21] и выделены в культуре в 1998 г. [22, 23]. В нормальной ПЖ они расположены в непосредственной близости от ацинарных клеток. В покое ПЗК могут рассматриваться как клетки с центральным телом и длинными цитоплазматическими выступами, простирающимися вдоль основания смежных ацинарных клеток. Они содержат липидные капли в их цитоплазме с витамином А, который исчезает после их активации [24, 25]. Подсчитано, что в состоянии покоя ПЗК составляют 4–7 % от всех паренхиматозных клеток в нормальной ПЖ [22, 23]. В норме функция этих клеток заключается в поддержании нормальной анатомии ПЖ: активированные ПЗК участвуют в процессах восстановления тканей после повреждений, в том числе после панкреонекроза [3, 26, 27].

В последние годы накоплены убедительные доказательства о ключевой роли ПЗК в фиброгенезе ПЖ при ХП [22, 23, 28–31]. В ответ на повреждение ПЗК переходят из неактивного состояния в активированный фенотип миофибробластов. Последние синтезируют и выделяют избыточное количество белков экстрацеллюлярного матрикса, что ведет к фиброзным изменениям ПЖ.

К потенциальным возбудителям ПЗК в естественных условиях относятся этанол и его метаболиты (ацетальдегид), активные формы кислорода; паракринные факторы, такие как цитокины (интерлейкин (IL)-1, IL-6, IL-8 и фактор некроза опухоли); факторы роста: тромбоцит-производный фактор роста (PDGF)

и трансформирующий фактор роста β_1 (TGF- β_1), ангиотензин II, образованные при повреждении клеток ПЖ и лейкоцитов [32–38]. ПЗК могут самостоятельно синтезировать данные факторы роста, аутокринно поддерживая активный миофибробластный фенотип. Это проявляется прогрессированием панкреатического фиброза даже при прекращении действия панкреатит-провоцирующих факторов. Активированные ПЗК синтезируют аутокринные факторы, такие как PDGF, TGF- β_1 , активин А, цитокины (IL-1, IL-6 и TRAIL) и провоспалительные молекулы (циклооксигеназа 2 (ЦОГ-2)), эндотелин 1. Они закрепляют активированный фенотип [35, 37, 39–42].

Активный фенотип ПЗК характеризуется синтезом α -гладкомышечного актина, глияльного фибриллярного кислого белка, коллагена I и III типа, десмина, виментина, металлопротеиназ 1, 2, тканевых ингибиторов металлопротеиназ 1, 2, протеогликанов и гиалуроновой кислоты.

Развитие фиброгенеза начинается с некроза ткани и аутопереваривания, за которыми следуют воспаление и индукция фиброзной реакции [43, 44]. На начальной стадии развития острого панкреатита ПЗК находятся в тесной связи с макрофагами вокруг участков некроза, а при формировании фиброза они концентрируются в перилобарных пространствах. В период стабилизации воспалительного процесса количество ПЗК заметно уменьшается — они обнаруживаются в основном рядом с поврежденными протоками [44].

В дополнение к производству компонентов внеклеточного матрикса ПЗК обладают широким спектром клеточных функций, связанных с реализацией местного иммунитета, воспаления, ангиогенеза, а по последним данным, еще и фагоцитарной функцией. Они могут регулировать эндокринные функции в ПЖ через холецистокинин-индуцированное высвобождение ацетилхолина. ПЗК индуцируют апоптоз и снижают экспрессию инсулина в бета-клетках, что является новым механизмом развития диабета у пациентов с ХП [45, 46].

Механизм поддержания процесса фиброза в ПЖ, особенно после прекращения действия повреждающего действия, неясен. Считается, что он зависит от гипертензии в ткани ПЖ, гипергликемии, внутриклеточной реактивной продукции активных форм кислорода, активации протеазактивированного рецептора 2. Индукция ЦОГ-2, бактериальная инфекция, самоактивация ПЗК играют определенную роль в поддержании панкреатического фиброза [46]. Таким образом, неизвестны механизмы, поддерживающие прогрессирование панкреатического фиброза даже при прекращении действия панкреатит-провоцирующих факторов. Несмотря на очевидность влияния протоковой гипертензии на течение заболевания и болевой синдром, механизмы этих процессов полностью не изучены.

Цель исследования: оценить место взаимосвязи фиброзных изменений паренхимы ПЖ, ее гипоксии и панкреатической протоковой гипертензии в патогенезе ХП.

Материалы и методы

В проспективное исследование было последовательно включено 40 пациентов, страдавших осложненным хроническим панкреатитом и оперированных в период с января 2015 по декабрь 2016 года в хирургических отделениях Минской областной клинической больницы. Критерии включения: возраст старше 18 лет, информированное согласие пациента; наличие ХП, осложненного магистральной или периферической гипертензией в правом и левом секторе ПЖ. Всем пациентам выполнены резекционно-дренирующие хирургические вмешательства на поджелудочной железе ($n = 40$), в том числе 28 бернских вариантов операции Бегера и 12 операций Фрея, в 16 наблюдениях они сочетались с продольной панкреатовирсунготомией ($n = 9$) или вирсунгэктомией ($n = 7$) в области тела хвоста ПЖ.

У всех 40 пациентов интраоперационно измеряли тканевую оксиметрию паренхимы ПЖ с помощью соматического датчика церебрального оксиметра INVOS 5100 (Somanetics, США). У 12 пациентов с расширенным вирсунговым протоком выполнено интраоперационно прямое измерение внутрипротокового давления с помощью системы для инвазивного измерения давления монитором «Интеграл 12» (Республика Беларусь).

Материалом для морфологического исследования стали 40 участков ПЖ после резекции ее головки. Контрольную группу составили 5 образцов ткани ПЖ без патологии, полученные в отделении общей патологии Управления Государственного комитета судебных экспертиз по Минской области от умерших в результате несчастных случаев. Операционный материал стандартно обрабатывали, окрашивали гематоксилином и эозином и трихромом. Изучение препаратов и изготовление микрофотографий проводили с помощью световых микроскопов Axio Imager (Zeiss, Германия) и DMLS (Leica, Германия).

Для количественной оценки степени выраженности фиброзных изменений измеряли площадь фиброза в образце ткани ПЖ в 5 случайно выбранных полях зрения при увеличении $\times 100$, вычисляли среднее значение и определяли процент фиброза. Оценивали 3 степени фиброза: I степень (слабо выраженные фиброзные изменения) — площадь фиброза составила 0–24 %; II степень (умеренно выраженные фиброзные изменения) — площадь фиброза 25–49 %; III степень (значительно выраженные фиброзные изменения) — площадь фиброза > 50 %.

Количественную оценку содержания гликогена проводили полуколичественным методом на препаратах, окрашенных ШИК-реакцией. Содержание гликогена оценивали по шкале от 0 до 4 баллов. В контрольной группе с наибольшей интенсивностью окраски в реакции с шифф-йодной кислотой выставляли 4 балла, полное отсутствие окрашивания на гликоген принималось за 0 баллов.

Иммуногистохимическое исследование (ИГХ) уровней экспрессии молекулярно-биологических

маркеров TGF- β_1 и альфа-гладкомышечного актина (α -SMA) проведено с использованием моно- и поликлональных антител. Результат ИГХ выявления α -SMA представлен в виде интенсивного гомогенного коричневого окрашивания цитоплазмы гладкомышечных клеток, эндотелиальных клеток, панкреатических звездчатых клеток. ПЗК среди клеток, экспрессирующих α -SMA, определялись по фибробластоподобному фенотипу.

Количественную оценку экспрессии TGF- β_1 выполняли путем анализа цифрового изображения, полученного с помощью микроскопа Leica DMLS с программным обеспечением (Германия) и цифровой камерой JVC (при увеличении в 200 раз и минимальном количестве полей зрения 50), с использованием алгоритма positive pixel count и программы для морфометрии Aperio Image Scope. Рассчитывали индекс экспрессии биомолекулярных маркеров по формуле: число позитивных пикселей/общее число пикселей $\times 100$.

Количественную оценку численности ПЗК выполняли путем подсчета числа α -SMA-позитивных звездчатых клеток на участках фиброза в поле зрения на увеличении в 400 раз (минимальное количество полей зрения — 10).

Для оценки содержания в крови TGF- β_1 использовали наборы Human Trans for men growth factor beta-1 ELISA Kit (EIAab, Китай) для иммуноферментного анализа. Оптическую плотность измеряли на иммуноферментном анализаторе SIRIO S SEAC (Италия).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью пакета статистических программ Statistica 10.0 (Version 10-Index, StatSoft Inc., США). Для проверки нормальности распределения данных использовали метод Колмогорова — Смирнова, а также показатели эксцесса и асимметрии. Различия между выборками оценивали, используя U-тест Манна — Уитни и тест Краскела — Уоллеса. Представление результатов: Me (медиана) — значение, справа и слева от которого на оси значений признака располагаются равные количества значений признака данной выборки; 25-й; 75-й процентиль. Достоверным считалось различие при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

После выполнения операций летальных исходов не было. Осложнения составили 16,7 %. Макроскопически во время вмешательства были выявлены следующие изменения: псевдокисты имели место у 18 пациентов (42 %), стеноз двенадцатиперстной кишки — у 6 (15 %), билиарная гипертензия — у 15 (37,5 %), портальная гипертензия — у 7 (17,5 %).

При морфологическом исследовании операционных препаратов I степень фиброза не выявлялась, II степень выявлена у 18 пациентов (45 %) — 1-я группа, III степень — у 22 пациентов (55 %) — 2-я группа.

Показатель насыщения гемоглобина кислородом (StO₂) ткани ПЖ в общей группе составил 54,4 (49,1; 61,1) % с колебаниями от 36 до 65 %. Отмечена достоверная зависимость StO₂ от степени фиброза (табл. 1),

Таблица 1. Насыщение гемоглобина кислородом поджелудочной железы у пациентов с ХП

Группа	Насыщение гемоглобина кислородом, % Me (25; 75)
1-я (умеренный фиброз)	58,8 (51,1; 62,5)
2-я (выраженный фиброз)	42* (36,1; 48,7)

Примечание: * — различия статистически значимы по сравнению с группой 1 ($p < 0,05$).

то есть при нарастании степени фиброза снижается оксигенация ткани ПЖ.

Показатели внутрипротокового давления при интраоперационном прямом измерении во всех наблюдениях превышали нормальные (7–10 мм рт.ст.)

(Bradley E.L. III, 1982; Ebbehøj N., 1986) и составили 34,2 (26,6; 45,3) мм рт.ст. с максимальным уровнем 56 мм рт.ст. Зависимости внутрипротокового давления от степени фиброза не выявлено.

При постановке ШИК-реакции в ацинарной ткани ПЖ в контрольной группе четко определялись ШИК-положительные углеводные соединения, имеющие вид зерен, которые окрашивались в темно-розовый цвет (рис. 1). Часто выявлялись зернистые включения темного цвета, которые не были похожи на гликоген, но в то же время могли быть деструктивными углеводными компонентами. В межацинарных пространствах ПЖ обнаруживались отросчатые синцитиальные структуры (рис. 2).

В ацинусах в 1-й группе со степенью фиброза 25–49 % ШИК-положительных веществ встречалось мало, гранулы гликогена были бледно-розового цвета, мелкие и практически одинаковых размеров (рис. 3).

Рисунок 1. ШИК-реакция в ацинарной зоне в норме, $\times 100$

Рисунок 2. ШИК-реакция в участках соединительной ткани в норме, $\times 100$

Рисунок 3. ШИК-реакция в ацинарной зоне в группе со степенью фиброза 25–49 %, $\times 100$

Рисунок 4. ШИК-реакция в зонах склероза и тубуло-островковом комплексе в группе со степенью фиброза 25–49 %, $\times 100$

Апикальная часть эпителия протоков проявляла ярко-малиновый цвет, как и железистый эпителий, который окрашивался в бледно-розовый цвет. ШИК-реакция показала умеренное окрашивание мукопротеидов экстрацеллюлярного матрикса зоны склероза (рис. 4).

Бледно-розовую окраску имели ШИК-положительные вещества в клетках тубуло-островкового комплекса.

В группе со степенью фиброза > 50 % цитоплазма клеток ацинарной зоны, представленной в большинстве случаев тубуло-островковыми комплексами, окрашивалась слабо или умеренно (рис. 5). Также наблюдалось неравномерное умеренное или слабое окрашивание ШИК-положительных веществ в протоковом эпителии, тубулярном комплексе и межацинарных пространствах. В цитоплазме фибробластов зон фиброза, в тубулярном комплексе и коллагеновых волокнах отмечалось слабое или умеренной силы окрашивание ШИК-методом гликогена, мукопротеидов межклеточного матрикса (рис. 6).

Таким образом, гистохимический анализ поджелудочной железы в норме показал, что реактивность ее тканей достаточно хорошо выражена, что проявлялось положительной фуксинофилией при ШИК-реакции. Так как одним из важных углеводов является гликоген, который содержится в организме в местах высокой метаболической активности и служит источником глюкозы, то есть энергетическим субстратом, гистохимические исследования на наличие и распределение углеводного компонента в ткани ПЖ могут являться критерием степени ишемии.

При количественной оценке содержания гликогена у пациентов с разной степенью фиброза статистически значимых различий между группами не выявлено ($p > 0,05$), однако наблюдалась тенденция к снижению количества ШИК-положительных веществ в ткани ПЖ по сравнению с нормой в 4 раза (табл. 2).

Рисунок 5. ШИК-реакция в тубуло-островковом комплексе группы со степенью фиброза > 50 %, $\times 100$

Таблица 2. Оценка содержания гликогена у пациентов с разной степенью фиброза ПЖ

Группа	Содержание гликогена, баллы Ме (25; 75)
1-я	1 (0,5; 2,0)
2-я	0,75 (0,5; 2,0)
Контроль (фиброз отсутствует)	4 (4,0; 4,0)

Таблица 3. Содержание TGF- β_1 в сыворотке пациентов с ХП с различной степенью фиброза

Группа	Ме (25; 75), нг/мл
1-я	92,14 (93,29; 100,27)
2-я	96,66 (90,12; 105,98)

Не выявлено достоверных различий в концентрации TGF- β_1 в сыворотке крови пациентов с ХП различной степени фиброза (табл. 3).

При окрашивании с антителами к TGF- β_1 определялось выраженное коричневое окрашивание эндотелиальных клеток кровеносных и лимфатических сосудов, фибробластов, компоненты экстрацеллюлярного матрикса демонстрировали светло-коричневое окрашивание (рис. 7). Ацинарные клетки окрашивались неравномерно (рис. 8).

В местах скоплений тубуло-островковых комплексов отмечалось диффузно-очаговое окрашивание с антителами к TGF- β_1 (рис. 9). Более интенсивно окрашивались ациноциты с дистрофическими изменениями: нечеткими границами, размытыми ядрами, мелковакуольной дистрофией и клетки островков Лангерганса (рис. 10).

Визуализировались плазматические клетки с выраженным окрашиванием цитоплазмы. Протоковый эпителий окрашивался диффузно.

Рисунок 6. Окрашивание гликогена в ацинарной зоне в группе со степенью фиброза > 50 %, $\times 100$

Таблица 4. Количественная оценка экспрессии TGF- β_1 у пациентов с разной степенью фиброза

Группа	ИЭ, % Me (25;75)
1-я (умеренный фиброз)	5,02* (3,18; 7,21)
2-я (выраженный фиброз)	6,04 (4,0; 8,49)

Примечание: * — различия статистически значимы по сравнению с группой 2 ($p < 0,001$).

Количественная оценка уровня экспрессии TGF- β_1 выявила достоверное ($p < 0,001$) увеличение экспрессии TGF- β_1 в ткани ПЖ у второй группы пациентов с ХП по сравнению с первой (табл. 4).

Рисунок 7. Экспрессия TGF- β_1 в фибробластах и эндотелиальных клетках сосудов зоны фиброза ПЖ, $\times 400$

Рисунок 8. Экспрессия TGF- β_1 в панкреоцитах и фибробластах ацинарной зоны ПЖ, $\times 400$

Рисунок 9. Экспрессия TGF- β_1 в тубуло-островковом комплексе зоны фиброза ПЖ, $\times 400$

Рисунок 10. Экспрессия TGF- β_1 в клетках ацинарной зоны и зоны перидуктального фиброза ПЖ, $\times 400$

При окрашивании с антителами к α -SMA наблюдалось интенсивное окрашивание цитоплазмы ПЗК, гладкомышечных клеток, эпителиальных и миоэпителиальных клеток (рис. 11). Мозаично окрашивалось вещество экстрацеллюлярного матрикса. Эндотелиальные клетки гемо- и лимфокапилляров окрашивались сильно позитивно (рис. 12).

α -SMA-позитивные ПЗК морфологически были сходны с фибробластами — веретеновидная или округлая (овоидного типа) отросчатая форма. Гладкомышечные клетки — веретеновидные, не имеющие отростков. Интенсивно экспрессировали α -SMA эндотелий сосудов и ПЗК зоны склероза (рис. 13). В гладкомышечных клетках крупных сосудов отмечалось выраженное окрашивание цитоплазмы и диффузное

(неравномерное) окрашивание мембранных структур (рис. 14).

Статистический анализ показал достоверное ($p < 0,0001$) увеличение количества звездчатых клеток во второй группе по сравнению с первой (табл. 5).

Корреляционный анализ показал наличие умеренной силы положительной связи между количеством активных ПЗК и степенью фиброза ПЖ ($r = 0,32$; $p < 0,05$). Так как активация ПЗК сопровождается активацией синтеза ими компонентов экстрацеллюлярного матрикса, увеличение количества активных ПЗК приводит к стимуляции фиброгенеза.

В результате проведенных исследований получены следующие результаты.

Таблица 5. Количество α -SMA-позитивных ПЗК у пациентов с разной степенью фиброза

Группа	Количество клеток в поле зрения; Me (25; 75)
1-я (умеренный фиброз)	10* (7,5; 14)
2-я (выраженный фиброз)	12 (9,5; 16)

Примечание: * — различия статистически значимы по сравнению с группой 2 ($p < 0,001$).

Рисунок 11. Экспрессия α -SMA в ПЗК и гладкомышечных клетках зоны фиброза ПЖ, $\times 400$

Рисунок 12. Экспрессия α -SMA в ПЗК, эпителиальных и гладкомышечных клетках ацинарной зоны и зоны фиброза ПЖ, $\times 400$

Рисунок 13. Экспрессия α -SMA в эпителиальных клетках и ПЗК зоны фиброза ПЖ, $\times 400$

Рисунок 14. Экспрессия α -SMA в гладкомышечных клетках и ПЗК, $\times 400$

Окрашивание ШИК-методом (на гликоген) ткани поджелудочной железы является достаточно информативным маркером ее ишемического повреждения. У пациентов со слабой фуксинофилией или ее отсутствием отмечается высокая степень фиброза ($> 50\%$) и низкое насыщение ткани ПЖ кислородом.

В крови пациентов с ХП наблюдается тенденция к увеличению $TGF-\beta_1$ в группе с фиброзом $> 50\%$ по сравнению с фиброзом 25–49 % в 1,5 раза.

В ткани ПЖ пациентов с ХП отмечается увеличение экспрессии $TGF-\beta_1$ по мере прогрессирования фиброзных изменений в ПЖ ($p < 0,001$).

Рост количества ПЗК коррелирует с увеличением степени фиброзных изменений в ПЖ ($r = 0,29$; $p < 0,05$).

Обсуждение

Звездчатые клетки ПЖ являются причиной развития фиброза и образования белковой стромы для конкрементов через очаги миелинизации. Деструктивные процессы охватывают стенку межациназных протоков и околопротоковое пространство, состоящее из соединительной ткани и проходящих в ней кровеносных капилляров и нервных волокон. В результате прогрессирующего фиброза перидуктальная область замещается грубой волокнистой соединительной тканью, которая, разрастаясь, суживает просвет протоков и сдавливает проходящие в ней сосуды микроциркуляторного русла ПЖ. Развивающаяся вторичная ишемия ткани ПЖ через стимуляцию звездчатых клеток может быть причиной непрерывного прогрессирования фиброза в ПЖ. Таким образом, просвет периферических протоков суживается вплоть до стриктур, а в просвете формируются конкременты. Создаются условия для развития периферической протоковой гипертензии, что является дополнительным патогенетическим фактором стойкой абдоминалгии при ХП. Усиливают периферическую протоковую гипертензию процессы фиброза в эпителии протоков всех уровней. Протоковая гипертензия формируется за счет трех компонентов: фиброза самой стенки протоков, сдавления протоков извне перидуктальным фиброзом, формирования конкрементов в просвете протоков.

Прямая интраоперационная оксиметрия показывает, что ткани ПЖ при хроническом панкреатите находятся в состоянии хронической ишемии. Это подтверждается снижением содержания гликогена в клетках поджелудочной железы. Слабое ШИК-окрашивание участков ПЖ указывает на низкую метаболическую активность клеток и может служить для оценки степени ишемии ПЖ. Оценка степени ишемии в ПЖ по количественному содержанию ШИК-положительных веществ и уровня оксигенации показывает, что пропорционально увеличению степени фиброза снижается содержание гликогена в клетках ПЖ, расходуемого на поддержание энергетического метаболизма. Таким образом, доказано, что степень выраженности фиброзных изменений ткани ПЖ

коррелирует с уровнем гипоксии этой ткани. В свою очередь, ишемия ткани ПЖ приводит к развитию фиброзных изменений.

При хроническом панкреатите существенный вклад в развитие фиброзных изменений ПЖ вносят панкреатические звездчатые клетки. Они секретируют множество белков экстрацеллюлярного матрикса, что ведет к фиброзным изменениям ПЖ. Активный фенотип ПЗК характеризуется экспрессией α -SMA, который используется в качестве главного маркера звездчатых миофибробластов. Количество активных ПЗК прямо коррелирует со степенью фиброзных изменений ($r = 0,29$; $p < 0,05$). Таким образом, развитию тяжелого фиброза ПЖ способствуют пролиферация и увеличение количества α -SMA-позитивных ПЗК в ткани.

При исследовании трансформирующего фиброзного фактора $TGF-\beta_1$, стимулирующего пролиферацию фибробластов, коллагенообразование и фиброз, в крови и ткани ПЖ у пациентов с ХП отмечалась тенденция к увеличению (в крови) и статистически значимое увеличение (в ткани) маркера у пациентов с тяжелой степенью фиброза ($> 50\%$). Таким образом, повышение экспрессии $TGF-\beta_1$ является маркером тяжести фиброзных изменений. Однонаправленное изменение $TGF-\beta_1$ в сыворотке крови и ткани ПЖ (с прогрессированием фиброза повышается содержание $TGF-\beta_1$ в крови и ткани) свидетельствует об активации синтеза белка, а не об увеличении его в крови вследствие цитолиза. Таким образом, выявлено, что нарастающий фиброз железы, вызывая ее ишемическое повреждение через факторы роста ($TGF-\beta_1$), оказывает влияние на увеличение количества и активности ПЗК, которые, в свою очередь, приводят к росту выраженности фибротических изменений. Свой вклад в нарастание ишемии ПЖ осуществляет протоковая гипертензия. Сдавлением и деформацией протоков фиброзными тканями панкреатолиты протоков приводят к повышению давления в них — развитию протоковой гипертензии. Протоковая гипертензия характерна как для магистральных, так и для периферических протоков. Высокий уровень протоковой гипертензии (до 56 мм рт.ст. в нашем исследовании) значимо снижает перфузионное давление и, соответственно, оксигенацию тканей ПЖ.

Выводы

1. На основании прямых интраоперационных измерений и данных морфологического обследования установлено, что ткани ПЖ при хроническом панкреатите испытывают хроническую гипоксию.

2. Развитие хронической гипоксии связано с прогрессирующим фиброзом перидуктальных областей с непосредственным сдавлением проходящих в них сосудов микроциркуляторного русла ПЖ, их воспалительным повреждением, а также развитием протоковой гипертензии, которая ввиду высоких значений значимо снижает перфузионное давление в микроциркуляторном русле.

3. Степень фиброза поджелудочной железы коррелирует с уровнем гипоксии поджелудочной железы.

4. Гипоксия ткани ПЖ (так же как и некроз), в свою очередь, через активацию звездчатых клеток цитокинами и факторами роста стимулирует развитие фиброза.

5. Теорию развития ХП, которая основывается на концепции последовательности некроза — фиброза при развитии рецидивирующего очагового ОП, можно дополнить концепцией «фиброз — гипоксия — фиброз», что объясняет прогрессирование панкреатического фиброза даже при прекращении действия панкреатит-провоцирующих факторов.

6. Гипоксия ПЖ наряду с протоковой гипертензией может быть значимым фактором в формировании хронического болевого синдрома при ХП.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии какого-либо конфликта интересов при подготовке данной статьи.

Список литературы

1. Worning H. Incidence and prevalence of chronic pancreatitis / Beger H.G., Büchler M., Ditschuneit H., Malfertheiner P. // *Chronic Pancreatitis*. — Berlin: Heidelberg Springer, 1990. — P. 8-14.
2. Mössner J. Epidemiology of chronic pancreatitis / Beger H.G., Büchler M., Malfertheiner P. // *Standards in Pancreatic Surgery*. — Berlin: Springer, 1993. — P. 263-271.
3. Apte M. The fibrosis of chronic pancreatitis: new insights into the role of pancreatic stellate cells / M. Apte, R. Pirola, J. Wilson // *Antioxid Redox. Signal.* — 2011. — Vol. 15. — P. 2711-2722.
4. Lankisch P.G. Pancreatitis / P.G. Lankisch, P.A. Banks. — Berlin: Springer, 1998. — P. 22-35.
5. Dreiling D.A. The natural history of alcoholic pancreatitis: update 1985 / D.A. Dreiling, M. Koller // *Mt. Sinai J. Med.* — 1985. — Vol. 52. — P. 340-342.
6. Sarles H. Chronic pancreatitis, relapsing pancreatitis, calcification of the pancreas / H. Sarles, H. Payan, F. Tasso [et al.] // *Gastroenterology*. — 2nd ed. — Philadelphia: WB Saunders, 1976. — P. 1040-1051.
7. Multigner I. Pancreatic stone protein II: implication in stone formation during the course of chronic calcifying pancreatitis / I. Multigner, H. Sarles, D. Lombardo [et al.] // *Gastroenterology*. — 1985. — Vol. 89. — P. 387-391.
8. Sarles H. Pathogenesis of chronic pancreatitis / H. Sarles, J.P. Bernard, L. Gullo // *Gut*. — 1990. — Vol. 31. — P. 629-632.
9. Noronha M. Alcohol and the pancreas. II. Pancreatic morphology of advanced alcoholic pancreatitis / M. Noronha, O. Bordalo, D.A. Dreiling // *Am. J. Gastroenterol.* — 1981. — Vol. 76. — P. 120-124.
10. Braganza J.M. Pancreatic disease: a casualty of hepatic «detoxification»? / J.M. Braganza // *Lancet*. — 1983. — Vol. 29. — P. 1000-1003.
11. Klöppel G. Pathology of acute and chronic pancreatitis / G. Klöppel, B. Maillet // *Pancreas*. — 1993. — Vol. 8. — P. 659-670.
12. Comfort M.W. Chronic relapsing pancreatitis. A study of twenty-nine cases without associated disease of the biliary or gastrointestinal tract / M.W. Comfort, E.E. Gambill A.H. Baggenstoss // *Gastroenterology*. — 1946. — Vol. 6. — P. 239-285, 376-408.
13. Ammann R.W. Course of alcoholic chronic pancreatitis: a prospective clinicomorphological long-term study / R.W. Ammann, P.U. Heitz, G. Klöppel // *Gastroenterology*. — 1996. — Vol. 111. — P. 224-231.
14. Korc M. Chronic pancreatitis is associated with increased concentrations of epidermal growth factor receptor, transforming growth factor, and phospholipase C gamma / M. Korc, H. Friess, Y. Yamanaka [et al.] // *Gut*. — 1994. — Vol. 35. — P. 1468-1473.
15. Van Laethem J.L. Localizing of transforming growth factor β -1 and its latent binding protein in human chronic pancreatitis / J.L. Van Laethem, J. Devière, A. Resibois [et al.] // *Gastroenterology*. — 1995. — Vol. 108. — P. 1873-1881.
16. Klöppel G. Fibrosis of the pancreas: the initial tissue damage and the resulting pattern / G. Klöppel, S. Detlefsen, B. Feyereabend // *Virchows Arch.* — 2004. — Vol. 445. — P. 1-8.
17. Klöppel G. The morphological basis for the evolution of acute pancreatitis into chronic pancreatitis / G. Klöppel, B. Maillet // *Virchows Arch.* — 1992. — Vol. 420. — P. 1-4.
18. Klöppel G. Chronic pancreatitis of alcoholic and nonalcoholic origin / G. Klöppel // *Semin. Diagn. Pathol.* — 2004. — Vol. 21. — P. 227-236.
19. Friedman S.L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver / S.L. Friedman // *Physiol. Rev.* — 2008. — Vol. 88. — P. 125-72.
20. Omary M.B. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases / M.B. Omary, A. Lugea, A.W. Lowe [et al.] // *J. Clin. Invest.* — 2007. — Vol. 117. — P. 50-9.
21. Watari N. Morphological studies on a vitamin A-storing cell and its complex with macrophage observed in mouse pancreatic tissues following excess vitamin A administration / N. Watari, Y. Hotta, Y. Mabuchi // *Okajimas Folia Anat. Jpn.* — 1982. — Vol. 58. — P. 837-58.
22. Apte M.V. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture / M.V. Apte, P.S. Haber, T.L. Applegate [et al.] // *Gut*. — 1998. — Vol. 43. — P. 128-33.
23. Bachem M.G. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans / M.G. Bachem, E. Schneider, H. Gross [et al.] // *Gastroenterology*. — 1998. — Vol. 115. — P. 421-32.
24. Zimmermann A. Pancreatic stellate cells contribute to regeneration early after acute necrotising pancreatitis in humans / A. Zimmermann, B. Gloor, A. Kappeler [et al.] // *Gut*. — 2002. — Vol. 51. — P. 574-578.
25. Lugea A. Pancreas recovery following cerulein-induced pancreatitis is impaired in plasminogen-deficient mice / A. Lugea, L. Nan, S.W. French [et al.] // *Gastroenterology*. — 2006. — Vol. 131. — P. 885-899.
26. Jaster R. Regulation of pancreatic stellate cell function in vitro: biological and molecular effects of all-transretinoic acid / R. Jaster, I. Hilgendorf, B. Fitzner // *Biochem. Pharmacol.* — 2003. — Vol. 66. — P. 633-641.
27. Talukdar R. Pancreatic stellate cells: new target in the treatment of chronic pancreatitis / R. Talukdar,

- R.K. Tandon // *J. Gastroenterol. Hepatol.* — 2008. — Vol. 23. — P. 34-41.
28. Bachem M.G. Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells / M.G. Bachem, M. Schunemann, M. Ramadani [et al.] // *Gastroenterology*. — 2005. — Vol. 128. — P. 907-21.
29. Kloppel G. Fibrosis of the pancreas: the initial tissue damage and the resulting pattern / G. Kloppel, S. Detlefsen, B. Feyerabend // *Virchows Arch.* — 2004. — Vol. 445. — P. 1-8.
30. Phillips P.A. Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover / P.A. Phillips, J.A. McCarroll, S. Park [et al.] // *Gut.* — 2003. — Vol. 52. — P. 275-82.
31. Vonlaufen A. Pancreatic stellate cells: partners in crime with pancreatic cancer cells / A. Vonlaufen, S. Joshi, C. Qu [et al.] // *Cancer Res.* — 2008. — Vol. 68. — P. 2085-93.
32. Apte M.V. Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis / M.V. Apte, P.S. Haber, S.J. Darby [et al.] // *Gut.* — 1999. — Vol. 44. — P. 534-541.
33. Luttenberger T. Platelet-derived growth factors stimulate proliferation and extracellular matrix synthesis of pancreatic stellate cells: implications in pathogenesis of pancreas fibrosis / A. Schmid-Kotsas, A. Menke // *Lab. Invest.* — 2000. — Vol. 80. — P. 47-55.
34. Schneider E. Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells / E. Schneider, A. Schmid-Kotsas, J. Zhao [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* — 2001. — Vol. 281. — P. 532-543.
35. Shek F.W. Expression of transforming growth factor-beta 1 by pancreatic stellate cells and its implications for matrix secretion and turnover in chronic pancreatitis / F.W. Shek, R.S. Benyon, F.M. Walker [et al.] // *Am. J. Pathol.* — 2002. — Vol. 160. — P. 1787-1798.
36. Mews P. Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis / P. Mews, P. Phillips, R. Fahmy [et al.] // *Gut.* — 2002. — 50. — P. 535-541.
37. Phillips P.A. Cell migration: a novel aspect of pancreatic stellate cell biology / P.A. Phillips, M.J. Wu, R.K. Kumar [et al.] // *Gut.* — 2003. — Vol. 52. — P. 677-682.
38. Hama K. Angiotensin II promotes the proliferation of activated pancreatic stellate cells by Smad7 induction through a protein kinase C pathway / K. Hama, H. Omnishi, H. Aoki [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2006. — Vol. 340. — P. 742-750.
39. Gao R. Connective tissue growth factor (CCN2) in rat pancreatic stellate cell function: integrin alpha5beta1 as a novel CCN2 receptor / R. Gao, D.R. Brigstock // *Gastroenterology*. — 2005. — Vol. 129. — P. 1019-1030.
40. Aoki H. Cyclooxygenase-2 is required for activated pancreatic stellate cells to respond to pro-inflammatory cytokines / H. Aoki, H. Ohnishi, K. Hama [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* — 2007. — Vol. 292. — P. 259-68.
41. Ohnishi N. Activin A is an autocrine activator of rat pancreatic stellate cells: potential therapeutic role of follistatin for pancreatic fibrosis / N. Ohnishi, T. Miyata, H. Ohnishi [et al.] // *Gut.* — 2003. — Vol. 52. — P. 1487-1493.
42. Masamune A. Endothelin-1 stimulates contraction and migration of rat pancreatic stellate cells / A. Masamune, M. Satoh, K. Kikuta [et al.] // *World J. Gastroenterol.* — 2005. — Vol. 11. — P. 6144-6151.
43. Ammann R.W. Course of alcoholic chronic pancreatitis: a prospective clinicomorphological long-term study / R.W. Ammann, P.U. Heitz, G. Kloppel // *Gastroenterology*. — 1996. — Vol. 111. — P. 224-31.
44. Detlefsen S. Fibrogenesis in alcoholic chronic pancreatitis: the role of tissue necrosis, macrophages, myofibroblasts and cytokines / S. Detlefsen, B. Sipos, B. Feyerabend [et al.] // *Mod. Pathol.* — 2006. — Vol. 19. — P. 1019-26.
45. Masamune A. Pancreatic stellate cells-multi-functional cells in the pancreas / A. Masamune, T. Shimosegawa // *Pancreatol.* — 2013. — Vol. 13. — P. 102-5.
46. Shimizu K. Mechanisms of pancreatic fibrosis and applications to the treatment of chronic pancreatitis / K. Shimizu // *J. Gastroenterology* — 2008. — Vol. 43. — P. 823-32.

Получено 18.05.2017 ■

Воробей О.В., Шулейко А.Ч., Володимирська Т.Е., Швед І.А., Віжніс Є.І., Орловський Ю.М., Маккі М.Ю.
Білоруська медична академія післядипломної освіти, м. Мінськ, Республіка Білорусь

Взаємозв'язок фіброзу і гіпоксії підшлункової залози в патогенезі хронічного панкреатиту

Резюме. *Актуальність.* Патогенез хронічного панкреатиту і больового синдрому не вивчено до кінця. *Мета дослідження:* оцінити взаємозв'язок фіброзних змін паренхіми підшлункової залози, її гіпоксії і панкреатичної протокової гіпертензії в патогенезі хронічного панкреатиту. *Матеріали та методи.* У проспективному дослідженні проведено морфологічне, імуногістохімічне вивчення препаратів підшлункової залози, інтраопераційно вивчені показники тканинної оксиметрії і панкреатичного протокового тиску у 40 пацієнтів, оперованих з приводу хронічного панкреатиту. *Результати.* Встановлено, що в міру прогресування фіброзних змін у тканині підшлункової залози пацієнтів із хронічним панкреатитом відзначається збільшення експресії трансформуючого фактора росту β_1 ($p < 0,001$), кількості панкреа-

тичних зірчастих клітин ($r = 0,32$, $p < 0,05$), зниження вмісту глікогену (маркер гіпоксії). При інтраопераційному прямому вимірі відзначені високі показники внутрішньопротокового тиску (34,2 (26,6; 45,3) мм рт.ст.), зниження оксигенації тканини підшлункової залози, які корелюють зі ступенем фіброзу. *Висновки.* Тканини підшлункової залози при хронічному панкреатиті відчувають хронічну гіпоксію, пов'язану з фіброзом і панкреатичною протоковою гіпертензією. У свою чергу, вторинна ішемія підшлункової залози може бути значущим фактором у прогресуванні фіброзу і хронічного больового синдрому при хронічному панкреатиті.

Ключові слова: хронічний панкреатит; фіброз підшлункової залози; гіпоксія підшлункової залози; панкреатична протокова гіпертензія; зірчасті клітини

A.V. Vorobei, A.Ch. Shuleiko, T.E. Vladimirkaya, I.A. Shved, Y.I. Vizhinis, Y.N. Orlovski, M.Y. Makki
Belarussian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, the Republic of Belarus

Interrelation of fibrosis and pancreatic hypoxia in pathogenesis of chronic pancreatitis

Abstract. Background. The pathogenesis of chronic pancreatitis and pain syndrome had not been fully studied. The aim of the study was to evaluate the interrelation of fibrotic and ischemic changes in the pancreatic parenchyma, and pancreatic duct pressure in the pathogenesis of chronic pancreatitis. **Materials and methods.** In a prospective study, a morphological, immunohistochemical study of pancreatic preparations was performed, and indicators of tissue oximetry and pancreatic duct pressure were studied intraoperatively in 40 patients operated for chronic pancreatitis. **Results.** The patients with chronic pancreatitis were found to have increased TGF- β_1 expression ($p < 0.001$), increased amount of pancreatic stellate cells ($r = 0.32$;

$p < 0.05$), decreased glycogen (marker of ischemia) with the progression of fibrotic changes in pancreatic tissue. The intraoperative direct measurement demonstrated high pancreatic duct pressure (34.2 (45.3, 26.6) mmHg), a decrease in oxygenation of pancreatic tissue that correlated with the fibrosis degree. **Conclusions.** Pancreatic tissue in chronic pancreatitis demonstrated chronic hypoxia associated with fibrosis and increased pancreatic ductal hypertension. So, secondary pancreatic ischemia can be a significant factor in the progression of fibrosis and chronic pain syndrome in chronic pancreatitis.

Keywords: chronic pancreatitis; pancreatic fibrosis; hypoxia of the pancreas; pancreatic ductal hypertension; pancreatic stellate cells