

УДК 599.323.4+591/577.+616.37

В. А. Макаруч, Г. О. Ушакова, О. М. Бабій, Б. Ф. Шевченко, Н. Ю. Ошмянська
 ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України», м. Дніпропетровськ,
 Дніпропетровський національний університет ім. О. Гончара, м. Дніпропетровськ

МОРФО-БІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ОКЛЮЗІЇ ПАНКРЕАТИЧНОЇ ПРОТОКИ

У роботі показано, що у експериментальних щурів при короточасній та тривалій оклюзії панкреатичної протоки патологічне депонування колагену з подальшим розвитком фіброзу органу відбувається у другому випадку, що підтверджується результатами комп'ютерної морфометрії (визначення співвідношення фіброзної тканини до загальної площі біоптату) та біохімічного аналізу (визначення маркерів фіброзу – гіалуронової кислоти, оксипроліну білковозв'язаного (ОПб/зв) та оксипроліну вільного (ОПв)). Одночасно визначено числові інтервали біохімічних коефіцієнтів кОПб/зв/кОПв для характеристики панкреатиту в гострій та хронічній стадії при тривалій оклюзії панкреатичної протоки: при запально-некротичній стадії гострого панкреатиту – 1,09–1,43, при атрофічно-префіброзній стадії гострого панкреатиту – 1,44–1,78, при фіброзній стадії хронічного панкреатиту – 1,79 і >.

Ключові слова: панкреатит, підшлункова залоза, оклюзія, фіброз.

Робота є фрагментом НДР «Вивчити механізми розвитку фібротичних процесів при хронічному панкреатиті та удосконалити технології їх хірургічної корекції», номер держреєстрації 0111U001065.

Хронічний панкреатит – це безперервне або рецидивуюче запальне захворювання підшлункової залози багатофакторної етіології, що характеризується прогресуючими та незворотніми морфологічними змінами. Пізня стадія хронічного панкреатиту характеризується прогресуючою втратою ендокринної та екзокринної тканини підшлункової залози і заміщенням її фіброзною тканиною [11,12,27].

Підшлункова залоза складається з ендокринних та екзокринних компартментів. Ендокринні часточки представлені α , β , δ , ϵ панкреатичними клітинами, організованими в острівці, а екзокринні – ацинусами, протоками та центроацинарними клітинами. Ацинарні клітини синтезують і секретують травні ензими, що знаходяться в багатій бікарбонатами рідині, яка проходить через складну мережу каналів. Термінальні або інтеркальовані протоки, зливаючись, утворюють внутрішньодолькові протоки, які, у свою чергу, формують міждолькові протоки, що в результаті входять в головну протоку підшлункової залози, яка відкривається в дванадцятипалу кишку, доставляючи туди панкреатичний секрет [25].

На сьогодні механізм розвитку хронічного панкреатиту вивчений недостатньо. Існує декілька теорій, що пояснюють патофізіологію даного захворювання: теорія токсичних метаболітів, теорія оксидативного стресу, теорія обструкції вивідних протоків, теорія некрозу-фіброзу [9]. При ускладненні відтоку панкреатичного секрету, підвищенні внутрішньопротокового тиску, інтрапанкреатичному рефлюксі дуоденального вмісту, в якому містяться активовані ентерокіназою протеолітичні ензими, жовчні кислоти, лізолецитин, емульговані жири та бактерії, може виникати ушкодження паренхіми підшлункової залози безпосередньо або через каскадну активацію панкреатичних ензимів. Ці зміни відбуваються на функціональному стані підшлункової залози: знижується обсяг секретії, дебіт ензимів та бікарбонатів, причому виявляються вони вже на ранніх стадіях захворювання [3]. Через неконтрольовану активацію трипсину відбувається перший епізод гострого панкреатиту. Виникає як первинна (гострофазова), так і вторинна (пізня) запальна відповідь. Компоненти первинної запальної відповіді (нейтрофіли, лімфоцити та цитокіни) формують протизапальний клітинний інфільтрат. При вторинній фазі гострого панкреатиту активуються профіброзні клітини, зокрема панкреатичні зірчасті клітини, що призводить до розвитку фіброзу. Якщо ініціюючі чинники усуненні, то клітинний та функціональний стан підшлункової залози відновлюється до норми. Подальший вплив цих чинників призводить до продукції цитокінів, які безпосередньо активують панкреатичні зірчасті клітини, внаслідок чого накопичується колаген, що призводить до формування периацинарного фіброзу, а в подальшому – до розвитку хронічного панкреатиту [9].

Дослідження на опосумах, проведені М.М. Lerch, А.К. Saluja, М. Runzi зі співавт. (1993) показали, що обструкції панкреатичної протоки достатньо, щоб викликати панкреонекроз та ушкодження ацинарних клітин [20]. Дана модель хронічного панкреатиту не є загальною, з чим і пов'язана невелика кількість існуючих досліджень, присвячених вивченню морфологічних і

слідок оклюзії лігатурою, накладеною на панкреатичну протоку.
 © Макаруч В.А., Ушакова Г.О., Бабій О.М., Шевченко Б.Ф., Ошмянська Н.Ю., 2014

Модель лігування дає змогу досліджувати особливості розвитку хронічного панкреатиту, відслідковувати заміщення ацинарної тканини органу фіброзною тканиною. При хронічному панкреатиті екзокринна функція підшлункової залози зберігається протягом тривалого часу навіть на пізніх стадіях захворювання, тому що функціональний резерв цього органу високий і симптоми екзокринної недостатності виникають тільки тоді, коли більше ніж 90% паренхіми залози втрачається. Watanabe зі співавт. аналогічні результати спостерігали у мишей, коли близько 60% відтоку панкреатичного соку було заблоковано шляхом лігування протоки підшлункової залози [11].

Оцінка ступеню фіброзу органу традиційно проводиться за результатами біопсії. Але цей метод має ряд недоліків, в тому числі і інвазивний характер, помилки при виборі місця взяття проби, малий розмір біоптату, суб'єктивний фактор змін, які зумовлюють від 15 до 65% варіабельності результату, ризик ускладнень [8,15]. Більш чутливими лабораторними предикторами можуть бути речовини, безпосередньо задіяні в процесі фіброгенезу – циркулюючі компоненти позаклітинного матриксу, в тому числі гіалуронова кислота [18], показники метаболізму сполучної тканини – оксипролін білковозв'язаний та вільний (ОПб/зв та ОПв) [1,17,19,24,26].

Метою роботи був морфологічний аналіз панкреатобіоптатів, визначення діагностичної цінності біохімічних маркерів фіброгенезу та розробка нового методу визначення ступеню фіброзної трансформації підшлункової залози за умов запалення, що викликано короткочасною та тривалою оклюзією панкреатичної протоки в експерименті.

Матеріал та методи дослідження. *Експериментальна модель хронічного панкреатиту.* Експеримент проводили на білих лабораторних щурах-самцях (вік – 6 місяців, 190–220 г) згідно Закону України № 3447-IV від 21.02.06 р. «Про захист тварин від жорстокого поводження». Для моделювання панкреатиту тваринам під наркозом (кетамін гідрохлорид, 110 мг/кг) здійснювали оклюзію панкреатичної протоки у хвостовій частині органу [23]. В залежності від використаної лігатури щури були розподілені на дві групи: I – короткочасна оклюзія панкреатичної протоки (розсмоктуючою лігатурою «Кетгут», 4/0) з наступним виведенням тварин з експерименту на 6 (n=6), 15 (n=6) та 30 добу (n=6); II – тривала оклюзія панкреатичної протоки (нерозсмоктуючою лігатурою «Prolene», 5/0) з наступним виведенням тварин з експерименту на 6 (n=6), 15 (n=6) та 30 добу (n=6). Псевдооперованих тварин виводили з експерименту на 6, 15 та 30 добу після оперативного втручання (n=18). Достовірних відмінностей між цими підгрупами не спостерігалося, тому за доцільне вважали об'єднати їх в одну контрольну групу. Для подальших досліджень використовували підшлункову залозу та плазму крові тварин.

Морфологічний аналіз. Для проведення комп'ютерної морфометрії, з метою оцінки фіброзних змін підшлункової залози при експериментальному панкреатиті, біоптати, отримані інвазивним методом, фотографували та здійснювали вимірювання за допомогою програми ImageJ 1.45S (розроблена в «National Institutes of Health», USA). Визначення маркерів фіброзу. Концентрацію гіалуронової кислоти в плазмі крові оцінювали за допомогою методу Голда, особливість якого полягає в тому, що лужний розчин (рН=8,6), який використовується для забарвлення несольфатованого глікозаміноглікану, гіалуронової кислоти, містить ацетат натрію – 0,5 М та альціан блакитний – 0,1% [16]. Рівень біохімічних маркерів активності проліферативних процесів у сполучній тканині визначали за вмістом в плазмі крові оксипроліну білковозв'язаного (ОПб/зв) та вільного (ОПв) за методом М.А. Осадчука, який полягає в тому, що оксипролін з реактивом Ерліха дає рожеве забарвлення [5,6].

Визначення церулоплазміну. Концентрацію церулоплазміну в плазмі крові щурів визначали за модифікованим методом Равіна, що базується на окисненні п-фенілендіаміну при участі церулоплазміну [4].

Статистичний аналіз. Статистичну обробку результатів досліджень здійснювали методами варіаційної статистики з використанням стандартного пакета прикладних програм SPSS for Windows 9.0. При цьому для показника визначали вибіркове середнє значення (M) та похибку середнього (m). Досліджувані співвідношення вважали достовірними при $p < 0,05$. Кореляційний аналіз проводили за Пірсоном (для даних, виражених в інтервальній шкалі) [7]. Для розрахунку числових діапазонів біохімічних коефіцієнтів використовували статистичні методи [7].

Результати дослідження та їх обговорення. При аналізі результатів комп'ютерної морфометрії комп'ютерний індекс фіброзу (КІФ, співвідношення фіброзної тканини до загальної площі біоптату) для контролю становив $0,50 \pm 0,07$ (рис. 1), на 6 добу експерименту, пов'язаного з короткочасною оклюзією панкреатичної протоки, КІФ дорівнював $1,06 \pm 0,34$ (і була встановлена запально-некротична стадія гострого панкреатиту, рис. 2А), на 15 добу – $2,00 \pm 0,69$ (і була

встановлена регенераторно-проліферативна стадія, рис. 2В), а на 30 добу – $5,90 \pm 1,54$ (ї була встановлена стадія відновлення, рис. 2С).

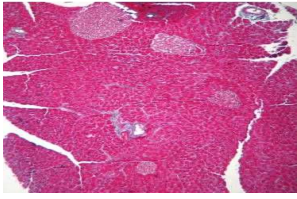


Рис. 1. Підшлункова залоза щура контрольної групи. Заб. за Маллорі в мод-ції Слінченко. х40.

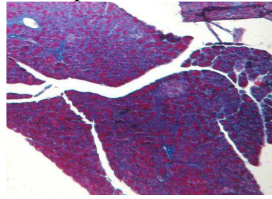
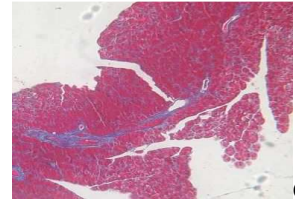
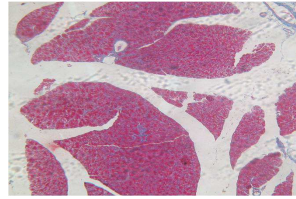
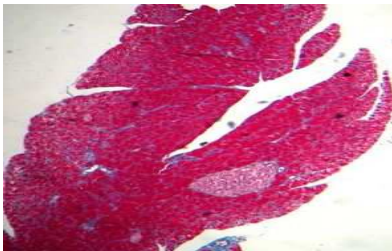


Рис. 2. Підшлункова залоза щура на 6 (А), 15 (В) та 30 добу (С) короткочасної оклюзії панкреатичної протоки. Заб. за Маллорі в модифікації Слінченко. х40.

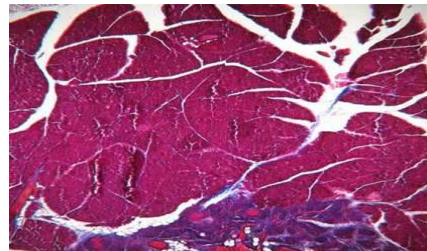


Слід відзначити, що на 30 добу експерименту КІФ в 11,8 разів ($p < 0,01$) перевищував контрольне значення, в 5,6 рази ($p < 0,05$) – аналогічний показник для 6 доби і в 3,0 рази – для 15 доби ($p < 0,05$) короткочасної оклюзії протоки підшлункової залози.

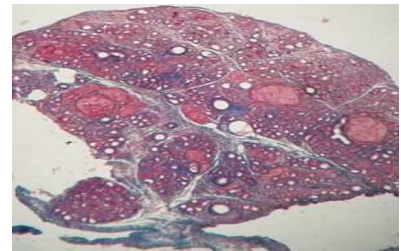
У II групі тварин на 6 добу експерименту КІФ дорівнював $1,13 \pm 0,66$ (встановлена запально-некротична стадія гострого панкреатиту, рис. 3А), на 15 добу – $3,11 \pm 2,03$ (встановлена перехідна, атрофічно-префіброзна стадія гострого панкреатиту, рис. 3В), а на 30 добу – $20,79 \pm 5,12$ (встановлена фіброзна стадія хронічного панкреатиту, рис. 3С).



А



В



С

Рис. 3. Підшлункова залоза щура на 6 (А), 15 (В) та 30 добу (С) тривалої оклюзії панкреатичної протоки. Заб. за Маллорі в модифікації Слінченко. х40.

Слід відзначити, що у II групі тварин на 30 добу експерименту КІФ в 41,6 разів ($p < 0,01$) перевищував контрольне значення, в 18,4 рази ($p < 0,01$) – аналогічний показник для 6 доби і в 6,7 разів – для 15 доби ($p < 0,01$) тривалої оклюзії панкреатичної протоки. Також КІФ у цій групі щурів при фіброзній стадії хронічного панкреатиту перевищував в 3,5 рази ($p < 0,05$) аналогічний показник I групи тварин на стадії відновлення. Отримані дані підтверджувалися результатами біохімічного дослідження, пов'язаними із визначенням в плазмі крові експериментальних тварин вмісту показників фіброгенезу. Так, у крові тварин з короткочасною оклюзією панкреатичної протоки достовірних змін вмісту гіалуринової кислоти на всіх етапах дослідження не було зареєстровано (рис. 4).

У II групі щурів з перехідною, атрофічно-префіброзною стадією гострого панкреатиту (15 доба) спостерігалось достовірне зростання концентрації гіалуринової кислоти на 25,0% ($p < 0,05$) з $1,28 \pm 0,06$ мкг/мл (контроль) до $1,88 \pm 0,11$ мкг/мл. При фіброзній стадії хронічного панкреатиту (30 доба) збільшення вмісту гіалуринової кислоти порівняно з контролем було ще суттєвішим – зростало на 46,9% ($p < 0,001$) до $1,88 \pm 0,10$ мкг/мл та вже достовірно перевищувало аналогічний показник у тварин з запально-некротичною стадією гострого панкреатиту на 31,5% ($p < 0,01$, 6 доба) (рис. 4).

Зміна вмісту в плазмі крові ОПб/зв та ОПв розглядається як показник метаболізму колагену і дає важливу інформацію про біохімічні та патологічні особливості фіброзу підшлункової залози. Так, у щурів I групи достовірних змін в концентрації даних показників не спостерігалось. За посилений анаболізм сполучної тканини у щурів із перехідною, атрофічно-префіброзною стадією гострого панкреатиту свідчило зростання вмісту ОПб/зв на 23,7% ($p < 0,01$) з $166,69 \pm 9,24$ мкмоль/л (контроль) до $206,16 \pm 13,80$ мкмоль/л, а за знижений катаболізм – зменшення вмісту ОПв на 22,1% ($p < 0,05$) з $9,96 \pm 0,60$ мкмоль/л (контроль) до $7,76 \pm 0,50$ мкмоль/л. Дані процеси поглиблювалися із прогресуванням панкреатиту і фіброзною трансформацією підшлункової залози: концентрація ОПб/зв на 30 добу зростала на 38,5% ($p < 0,001$) відносно контролю та на 25,7% ($p < 0,01$) порівняно з цим же показником на 6 добу, а концентрація ОПв знижувалася на 30,0% ($p < 0,01$) відносно контролю та на 25,5% ($p < 0,05$) порівняно з цим же показником на 6 добу експерименту (рис. 5 та рис. 6).

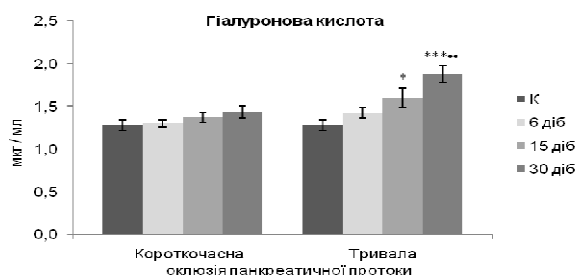


Рис. 4. Динаміка зміни вмісту гіалуронової кислоти у крові щурів з короткочасною та тривалою оклюзією панкреатичної протоки; К – контроль – псевдооперовані тварини, n=18, * - p<0,05, *** - p<0,001 – у порівнянні з контрольною групою, n=6; ** - p<0,01 – у порівнянні з групою тварин із 6 добовою оклюзією панкреатичної протоки, n=6.

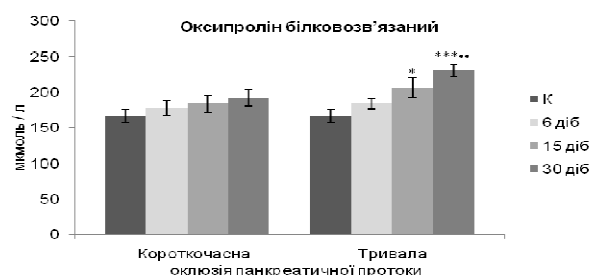


Рис. 5. Динаміка зміни вмісту оксипроліну білково-зв'язаного у крові щурів з короткочасною та тривалою оклюзією панкреатичної протоки; К – контроль – псевдооперовані тварини, n=18, * - p<0,05, *** - p<0,001 - у порівнянні з контрольною групою, n=6; ** - p<0,01 - у порівнянні з групою тварин з 6 добовою оклюзією панкреатичної протоки, n=6.

Розраховувався коефіцієнт ОПб/зв (кОПб/зв) та коефіцієнт ОПв (кОПв) і загальний коефіцієнт фіброзу кОПб/зв/кОПв, що дозволяє характеризувати прогресування фіброзних змін в підшлунковій залозі в залежності від визначеної нами морфологічної класифікації стадійності перебігу експериментального панкреатиту для короткочасної та тривалої оклюзії панкреатичної протоки. У щурів I групи на 6 добу експерименту при запально-некротичній стадії гострого панкреатиту коефіцієнт співвідношення кОПб/зв/кОПв дорівнював $1,12 \pm 0,06$, на 15 добу експерименту при регенераторно-проліферативній стадії – $1,24 \pm 0,02$, на 30 добу експерименту при стадії відновлення коефіцієнт співвідношення кОПб/зв/кОПв дорівнював $1,46 \pm 0,13$ (при встановленій нормі 1). Слід відзначити, що коефіцієнт співвідношення кОПб/зв/кОПв у групі щурів зі стадією відновлення (30 доба) був на 30,4% (p<0,05) вищим порівняно з групою тварин з запально-некротичною стадією гострого панкреатиту (табл. 1).

Таблиця 1

Концентрація біохімічних маркерів фіброзу в плазмі крові експериментальних тварин та розраховані коефіцієнти співвідношення кОПб/зв/кОПв (в чисельнику показники I групи в знаменнику – II групи)

Показник	Контроль (n=18)	6 доба (n=6)	15 доба (n=6)	30 доба (n=6)
		6 доба (n=6)	15 доба (n=6)	30 доба (n=6)
Гіалуронова к-та, мкг/мл	$1,28 \pm 0,06$	$1,30 \pm 0,04$	$1,37 \pm 0,06$	$1,44 \pm 0,07$
		$1,43 \pm 0,06$	$1,60 \pm 0,12^*$	$1,88 \pm 0,10^{***}$
ОПб/зв, мкмоль/л	$166,69 \pm 9,2$	$177,62 \pm 10,4$	$183,89 \pm 11,48$	$192,77 \pm 11,53$
		$183,62 \pm 7,43$	$206,16 \pm 13,8^*$	$230,81 \pm 8,8^{***}$
кОПб/зв	1	$1,07 \pm 0,06$	$1,10 \pm 0,07$	$1,16 \pm 0,07$
		$1,10 \pm 0,04$	$1,24 \pm 0,08$	$1,38 \pm 0,05^{**}$
ОПв, мкмоль/л	$9,96 \pm 0,60$	$9,58 \pm 0,56$	$8,86 \pm 0,44$	$8,18 \pm 0,84$
		$9,69 \pm 0,62$	$7,76 \pm 0,45^{*#}$	$6,97 \pm 0,39^{***}$
кОПв	1	$0,96 \pm 0,06$	$0,89 \pm 0,04$	$0,82 \pm 0,08$
		$0,97 \pm 0,06$	$0,78 \pm 0,05^{\#}$	$0,70 \pm 0,04^{**}$
кОПб/зв/ кОПв	1	$1,12 \pm 0,06$	$1,24 \pm 0,02$	$1,46 \pm 0,13^*$
		$1,17 \pm 0,11$	$1,63 \pm 0,18^{\#}$	$2,03 \pm 0,18^{**}$

Примітки: * – p<0,05, ** – p<0,01 та *** – p<0,001 – достовірність відмінностей між групою контролю (n=18) та дослідними групами щурів (n=6); # – p<0,05 – достовірність відмінностей між показниками на 6 та 15 добу експерименту; • – p<0,05, ** – p<0,01 – достовірність відмінностей між показниками на 6 та 30 добу експерименту.

У щурів II групи на 6 добу експерименту при запально-некротичній стадії гострого панкреатиту коефіцієнт співвідношення кОПб/зв/кОПв дорівнював $1,17 \pm 0,11$, на 15 добу експерименту при перехідній, атрофічно-префіброзній стадії гострого панкреатиту – $1,63 \pm 0,18$, що на 39,3% (p<0,05) вище, ніж у щурів на 6 добу, на 30 добу експерименту при фіброзній стадії хронічного панкреатиту – $2,03 \pm 0,18$ (при встановленій нормі 1). Слід відзначити, що коефіцієнт співвідношення кОПб/зв/кОПв у групі щурів з фіброзною стадією хронічного панкреатиту був на 73,5% (p<0,01) вищим порівняно з групою тварин з запально-некротичною стадією гострого панкреатиту (табл. 1).

Отримані співвідношення кОПб/зв/кОПв для щурів II групи на 6, 15 та 30 добу експерименту дозволили визначити числові інтервали коефіцієнтів, які при інтервалі значень 1,09–1,43 характеризують запально-некротичну стадію гострого панкреатиту і відсутність фіброзних змін, при 1,44–1,78 – перехідну, атрофічно-префіброзну стадію гострого панкреатиту, при $1,79 >$ - фіброзну стадію хронічного панкреатиту.

Відомо, що рівень церулоплазміну в крові зростає при гострих та хронічних запальних процесах, в тому числі і при панкреатиті. Так, максимальне зростання концентрації церулоплазміну спостерігалось в I та II групах щурів з запально-некротичною стадією гострого панкреатиту: на 40,22% ($p < 0,05$) з $475,13 \pm 40,38$ мг/мл (контроль) до $666,23 \pm 65,40$ мг/мл та на 34,4% ($p < 0,01$) до $638,58 \pm 26,84$ мг/мл відповідно. Достовірно високим був вміст даного показника і у тварин II групи з перехідною, атрофічно-префіброзною стадією трансформації підшлункової залози – збільшувався на 25,5% ($p < 0,05$) до $596,24 \pm 34,81$ мг/мл. Як у I, так і II групах тварин на 30 добу експерименту зниження вмісту церулоплазміну у порівнянні з 6 добою було достовірне: на 24,3% ($p < 0,05$) та на 19,1% ($p < 0,05$) відповідно для двох типів оклюзії панкреатичної протоки (рис. 7).

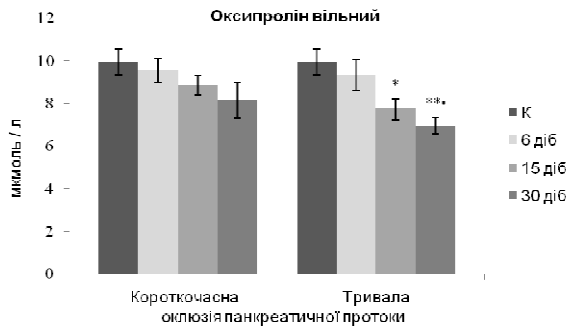


Рис. 6. Динаміка зміни вмісту оксипроліну вільного у крові щурів з короткочасною та тривалою оклюзією панкреатичної протоки; К – контроль – псевдооперовані тварини, $n=18$, * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ - у порівнянні з контрольною групою $n=6$; • - $p < 0,05$ - у порівнянні з групою тварин з 6 добовою оклюзією панкреатичної протоки, $n=6$.

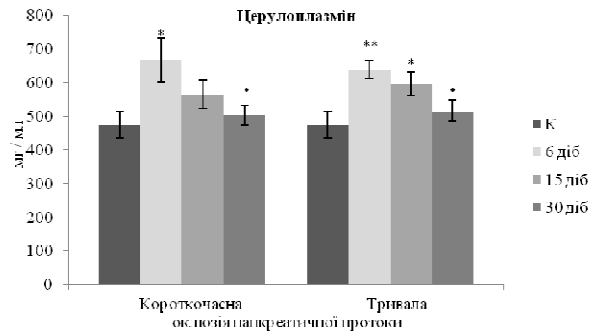


Рис. 7. Динаміка зміни вмісту церулоплазміну у плазмі крові щурів з короткочасною та тривалою оклюзією панкреатичної протоки; К – контроль – псевдооперовані тварини, $n=18$, * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ - у порівнянні з контрольною групою, $n=6$; • - $p < 0,05$ - у порівнянні з групою тварин з 6 добовою оклюзією панкреатичної протоки, $n=6$.

Більше десяти років тому назад стало відомо, що накопичення активованих панкреатичних зірчастих клітин відіграє ключову роль в розвитку фіброзу підшлункової залози при хронічному панкреатиті [21]. Незалежно від типу пошкоджуючого фактору, ефект від їх активації однаковий – надмірна продукція компонентів позаклітинного матриксу. У 1998 році Vachem зі співавт. вперше представили опис панкреатичних зірчастих клітин підшлункової залози. Вони розташовані в периацинарній, периваскулярній і перидуктальній частині органу. Ці клітини у стані спокою та активовані відрізняються за своїми морфологічними характеристиками, молекулярними маркерами та властивостями. Для активованих панкреатичних зірчастих клітин властиве збільшене ядро та відсутність жирових крапель [22]. Вони експресують проміжні філаменти, що характеризують декілька типів клітин – десмін, який властивий міоцитам; гліальний фібрилярний кислий протеїн, що характеризує астроцити; нестін, що характерний для нейроепітеліальних стовбурових клітин. Гладком'язовий актин α – є маркером для виявлення панкреатичних зірчастих клітин у ділянках фіброзу в підшлунковій залозі, як у щурів, так і у людини [9]. Вплив факторів, що провокують розвиток хронічного панкреатиту, призводить до ушкодження ацинарних клітин, протоків та ендотеліальних клітин і збільшеної продукції лейкоцитів. Ушкоджені клітини підшлункової залози здатні продукувати та вивільняти багато цитокінів, факторів росту, ангіотензин II і ендотелін 1, які активують панкреатичні зірчасті клітини. В результаті цього генеруються речовини, які можуть призводити до постійної активації даних клітин. Активовані панкреатичні зірчасті клітини можуть бути еліміновані шляхом апоптозу, що було продемонстровано в досліджах *in vivo*, або бути повернені в стан спокою, що спостерігається лише на клітинних культурах. Стійка активація зірчастих клітин, з іншого боку, призводить до прогресуючого фіброзу [22]. Фіброз підшлункової залози – характерна ознака хронічного панкреатиту [21].

Екстрацелюлярний матрикс складається із різноманітних компонентів, які приймають участь у підтримці нормальної архітектоники тканини залози та відіграють важливу роль в біологічних функціях органів [14]. Синтез, секреція та деградація компонентів позаклітинного матриксу динамічно змінюються в процесі тканинного ремоделювання. В основі фіброзу органу лежить дисбаланс між синтезом надлишку компонентів позаклітинного матриксу клітинами-продуцентами та зниженою деградацією протеїнів позаклітинного матриксу цинк-залежними ензимами родини матриксних металопротеїназ. Порушення балансу експресії між металопротеїназами та їх тканинними інгібіторами відбувається при хронічних запальних процесах. При хронічному панкреатиті підвищення продукції тканинного інгібітору металопротеїнази-1 панкреатичними

зірчастими клітинами сприяє фіброзу шляхом запобігання деградації колагену, тому його експресія виявляється обмежено в ділянках наявного фіброзу [10].

У поставленому нами експерименті, суть якого полягала у здійсненні короточасної та тривалої оклюзії панкреатичної протоки, фіброзна стадія хронічного панкреатиту у щурів визначалася лише у другому випадку, що підтверджувалося морфологічними та біохімічними дослідженнями. Це можна пояснити розсмоктуванням лігатури, накладеної на панкреатичну протоку, в період між 6 та 10 добою експерименту, пов'язаного із короточасною оклюзією протоки підшлункової залози. І, таким чином, відновлення прохідності панкреатичної протоки сприяло усуненню або зниженню ступеню вираженості патологічних змін в підшлунковій залозі, регенерації панкреатитів та підвищенні їх активності [3]. Достовірне зростання КІФ у I та II групі щурів спостерігалось на 30 добу експерименту в 11,8 разів ($p < 0,01$) та в 41,6 разів ($p < 0,01$) відповідно. В свою чергу, даний показник при тривалій оклюзії панкреатичної протоки в 3,5 рази ($p < 0,05$) перевищував аналогічний показник при короточасній оклюзії, що встановлює значну фіброзну трансформацію підшлункової залози саме у випадку тривалої оклюзії, а не при стадії відновлення.

Зростання концентрації гіалуронової кислоти в плазмі крові обумовлене збільшенням її продукції зірчастими клітинами та порушенням деградації гіалуронідазами через зменшення їх активності [13,15].

Таким чином, можна припустити, що із розвитком хронічного панкреатиту відбувається дисбаланс в системі «гіалуронова кислота - гіалуронідаза» в бік збільшення синтезу цього глікозаміноглікана. Отже, гіалуронова кислота – це неінвазивний маркер фіброзу, поява якого в плазмі крові може мати важливе значення при оцінці стадії фіброзу органу, в тому числі і підшлункової залози. Наше дослідження щурів з короточасною і тривалою оклюзією панкреатичної протоки, підтвердило важливість оцінки концентрації гіалуронової кислоти в плазмі крові для діагностики фіброзної стадії хронічного панкреатиту. Фіброз органу у експериментальних тварин дав змогу отримати краще уявлення про співвідношення «гіалуронова кислота-фіброз». При запально-некротичній стадії гострого панкреатиту достовірних змін концентрації даного показника порівняно з контролем не спостерігалось; при перехідній, атрофічно-префіброзній стадії трансформації підшлункової залози визначалася концентрація гіалуронової кислоти, що на 25,0% ($p < 0,05$) перевищувала контрольний показник; при фіброзній стадії перебудови підшлункової залози, визначалася концентрація гіалуронової кислоти, що на 46,9% ($p < 0,05$) перевищувала контрольне значення. Достовірних змін вмісту даного показника у крові щурів з короточасною оклюзією панкреатичної протоки не визначалось, що також пов'язано з відновленням клітинного та функціонального стану підшлункової залози після розсмоктування лігатури.

Незважаючи на те, що метаболізм сполучної тканини широко вивчався, проте все ж існує недостатньо інформації про відхилення та зміни біохімічних параметрів фіброзної трансформації підшлункової залози при розвитку хронічного панкреатиту. Ще один неінвазивний метод оцінки фіброзу тканини – це визначення концентрації ОПб/зв та ОПв в плазмі крові. Дослідження змін рівня цих показників дає цінну інформацію про біохімічні та патологічні процеси фіброзу в підшлунковій залозі. Підвищення рівня ОПб/зв свідчить про посилений синтез, утворення молодого незрілого колагену. ОПв – показник деградації колагену [1,17,19, 24,26].

Результати досліджень продуктів метаболізму колагену дозволили встановити, що вміст ОПб/зв та ОПв в плазмі крові щурів достовірно не змінювався протягом всього експерименту, пов'язаного з короточасною оклюзією панкреатичної протоки. Отримані дані, а саме: тенденція до підвищення вмісту ОПб/зв та зниження вмісту ОПв, свідчили про незначне колагенутворення в підшлунковій залозі тварин даної групи, яке супроводжувалося зниженою його деградацією.

Аналіз вмісту фракцій оксипроліну в плазмі крові тварин з установленою атрофічно-префіброзною стадією трансформації підшлункової залози при тривалій оклюзії панкреатичної протоки, показав порівняно з контролем статистично значуще підвищення вмісту ОПб/зв на 23,7% ($p < 0,01$) і зниження ОПв на 22,1% ($p < 0,05$), що свідчило про посилення фіброгенезу та зменшення деградації колагену в ураженому органі. Максимальне підвищення концентрації ОПб/зв на 38,5% ($p < 0,001$) і зниження вмісту ОПв на 30,0% ($p < 0,01$) на 30 добу експерименту означало, що на стадії хронізації панкреатиту превалюють процеси активного колагенутворення над його деградацією.

В розвитку запального процесу або в попередженні його можливих ускладнень приймає участь близько 30 білків крові, що мають загальну назву «гострофазні білки», до яких належить і церулоплазмін. Церулоплазмін – це мідьвмісний α_2 -глікопротеїн, який синтезується гепатоцитами та епітеліоцитами легень. При гострофазній відповіді важливим джерелом церулоплазміну є моноцити.

Він транспортує мідь мідьвмісним енізмам в плазмі крові, володіє антиоксидазною активністю, попереджує окиснення ліпідів в мембрані клітин. Церулоплазмін проявляє непрямий антимікробний ефект. Він входить в групу так званих пізніх реактантів гострої фази з помірним ступенем збільшення концентрації при запаленні, що відображає компенсаторно-приспосувальну реакцію організму [2]. В результаті нашого дослідження було встановлено, що у щурів як при короткочасній, так і при тривалій оклюзії панкреатичної протоки рівень церулоплазміну на 6 добу експерименту достовірно підвищувався на 40,2% ($p < 0,05$) та на 34,4% ($p < 0,01$) відповідно. У II групі тварин достовірно високою концентрація церулоплазміну залишалася і на 15 добу при перехідній, атрофічно-префіброзній стадії гострого панкреатиту на 25,5% ($p < 0,05$). А вже на 30 добу дослідження спостерігалось достовірне зниження вмісту даного показника на 24,3% ($p < 0,05$) та на 19,1% ($p < 0,05$) відповідно для короткочасної та тривалої оклюзії панкреатичної протоки відносно груп щурів з запально-некротичною стадією гострого панкреатиту.

Таким чином, отримані результати біохімічного дослідження стану сполучної тканини та запальних процесів в підшлунковій залозі щурів II групи на 6 добу експерименту характеризують запально-некротичну стадію гострого панкреатиту та свідчать про відсутність фіброзних змін органу, на 15 добу експерименту характеризують перехідну, атрофічно-префіброзну стадію трансформації підшлункової залози, на 30 добу експерименту – фіброзну стадію перебудови підшлункової залози.

Висновки

1. Результати комп'ютерної морфометрії панкреатобіоптатів показали, що при короткочасній оклюзії панкреатичної протоки розсмоктуючою лігатурою відбувається відновлення її прохідності та зниження ступеню вираженості патологічних змін в підшлунковій залозі вже до кінця другого тижня після оперативного втручання, а до кінця четвертого тижня експерименту у зразках із досліджуваного органу відзначалися лише периваскулярні та перидуктальні залишки фіброзної тканини. При тривалій оклюзії панкреатичної протоки нерозсмоктуючою лігатурою спостерігається протягом експерименту поступове патологічне депонування колагену з подальшим розвитком фіброзу підшлункової залози щурів.

2. Неінвазивний метод діагностики ступеню колагеноутворення в підшлунковій залозі щурів при короткочасній та тривалій оклюзії панкреатичної протоки, який заключається визначенням в плазмі крові концентрації гіалуронової кислоти, оксипроліну білковозв'язаного та вільного, підтвердив фіброзування ураженого органу лише у тварин з тривалою оклюзією панкреатичної протоки, що повністю співпадає з результатами морфологічного дослідження. Отримані інтервали співвідношення кОПб/зв/кОПв для щурів II групи на 6, 15 та 30 добу експерименту дозволяють характеризувати запально-некротичну стадію гострого панкреатиту, атрофічно-префіброзну стадію гострого панкреатиту та фіброзну стадію хронічного панкреатиту. Встановлене підвищення вмісту церулоплазміну в плазмі крові щурів обох дослідних груп відображає активність запального процесу в підшлунковій залозі, найбільш вираженого на стадії гострого панкреатиту.

Перспективи подальших досліджень. В подальшому планується дослідження впливу хронічного панкреатиту, викликаного тривалою оклюзією панкреатичної протоки, на розподіл нейроспецифічних протеїнів в підшлунковій залозі та головному мозку щурів за умов ендогенної інтоксикації.

Список літератури

1. Белобородова Е. В. Активность эластазо-, коллагеназоподобных протеиназ и их ингибиторов в плазме крови при метаболизме коллагена в условиях хронического течения заболеваний печени вирусной и токсической этиологии / Е.В. Белобородова, Э.И. Белобородова, О.Е. Акбашева [и др.] // Бюллетень СО РАМН. – 2010. – Т. 30, № 2. – С. 94–100.
2. Воробьева А.А. Острофазные белки лактоферрин и церулоплазмин при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки / А.А. Воробьева, А.А. Демидов // Вестник ВолГМУ. – 2007. – Т. 23, №3. – С. 62–64.
3. Звягинцева Т.Д. Дисфункция сфинктера Одди и хронический панкреатит / Т.Д. Звягинцева, И.И. Шаргород // Сучасна гастроентерологія. – 2013. – Т. 71, № 3. – С. 75–82.
4. Камышников В.С. Методы клинических лабораторных исследований / В.С. Камышников. Изд. 4-е. – М.: «Медпресс-информ», - 2011. – 752 с.
5. Осадчук М.А. Методі дослідження оксипроліна в крові і мочі / М.А. Осадчук // Лаб. дело. – 1979. – №8. – С. 456–458.
6. Осадчук М.А. Белковосвязанный оксипролин плазмы крови при остром вирусном гепатите / М.А. Осадчук, В.М. Капустин // Лаб. дело. – 1987. – №7. – С. 16–18.
7. Петри А. Наглядная статистика в медицине / А. Петри, К. Сэбин // – М.: Гэотар-Мед, - 2003. – 144 с.
8. Пентюк Н.О. Біохімічні маркери фіброзу печінки у хворих на хронічні гепатити та їхня діагностична цінність / Н.О. Пентюк // Сучасна гастроентерологія. – 2011. – Т. 57, № 1. – С. 58–63.
9. Сіренко О.Ю. Панкреатичні зірчасті клітини як морфологічна основа розвитку фіброзу підшлункової залози / О.Ю. Сіренко // Морфологія. – 2010. – Т. 4, № 1. – С. 5–12.

10. Туманський В.О. Імуногістохімічні особливості експресії матриксної металопротеїнази 9 та її тканинного інгібітора TIMP-1 при хронічному фіброзно-індуративному панкреатиті / В.О. Туманський, І.С. Коваленко // Патологія. – 2012. – Т. 24, №1. – С. 74 – 76.
11. Aghdassi A.A. Animal models for investigating chronic pancreatitis / A.A Aghdassi, J. Mayerle, S. Christochowitz and [et al.] // *Fibrogenesis & Tissue Repair*. – 2011. – 4: 26.
12. Bhanot U.K. Mechanisms of parenchymal injury and signaling pathways in ectatic ducts of chronic pancreatitis: implications for pancreatic carcinogenesis / U.K. Bhanot and P. Moller // *Laboratory Investigation*. – 2009. – Vol. 89. – P. 489–497.
13. Duterme C. Two Novel Functions of Hyaluronidase-2 (Hyal2) Are Formation of the Glycocalyx and Control of CD44-ERM Interactions / C. Duterme, J. Mertens-Strijthagen, M. Tammi [et al.] // *The Journal of biological chemistry*. – 2009. – Vol. 284, № 48. – P. 33495–33508.
14. Divoux A Architecture and the extracellular matrix: the still unappreciated components of the adipose tissue / A. Divoux and K. Clement // *Etiology and Pathophysiology*. – 2011. – Vol. 12. – P. 494–503.
15. El-Shabrawi M. Predictive accuracy of serum hyaluronic acid as a non-invasive marker of fibrosis in a cohort of multi-transfused Egyptian children with b-thalassaemia major / M. El-Shabrawi, M.Y. Zein El Abedin, N. Omar and [et al.] // *Arab Journal of Gastroenterology*. – 2012. – Vol. 13. – P. 45–48.
16. Gold E.W. The quantitative spectrophotometric estimation of total sulfated glycosaminoglycan levels / E.W. Gold // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1981. – Vol. 673. – P. 408–415.
17. George J. Biochemical Abnormalities during the Progression of Hepatic Fibrosis Induced by Dimethylnitrosamine / J. George and G. Chandrakasan // *Clinical Biochemistry*. – 2000. – Vol. 33, № 7. – P. 563–570.
18. Grippo P. J. Imaging the pancreatic ECM. Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment / Edited by P.J. Grippo and H.G. Munshi // – India: Transworld Research Network Kerala, - 2012. – P. 11–27.
19. Kliment C. R. A novel method for accurate collagen and biochemical assessment of pulmonary tissue utilizing one animal / C.R. Kliment, J.M. Englert, L.P. Crum [et al.] // *Int J Clin Exp Pathol*. – 2011. – Vol. 4, №4. – P. 349–355.
20. Lerch M.M. Models of Acute and Chronic Pancreatitis / M.M. Lerch, F.S. Gorelick // *Gastroenterology*. – 2013. – Vol. 144. – P. 1180–1193.
21. Masamune A. Roles of Pancreatic Stellate Cells in Pancreatic Inflammation and Fibrosis / A. Masamune, T. Watanabe, K. Kikuta [et al.] // *Clinical gastroenterology and hepatology*. – 2009. – Vol. 7. – P. 48–54.
22. Madro A. Can we expect progress in the treatment of fibrosis in the course of chronic pancreatitis? / A. MadroSłomka, K. Celinski // *Advances in Medical Sciences*. – 2011. – Vol. 56. – P. 132–137.
23. Page B.J. An Immunocytochemical Profile of the Endocrine Pancreas Using an Occlusive Duct Ligation Model / B.J. Page, D.F. Toit, C. Muller [et al.] // *Journal of the Pancreas*. – 2000. – Vol. 4, 1. – P. 191–203.
24. Pavlidis E.T. The effect of bevacizumab on colon anastomotic healing in rats / E.T. Pavlidis, K.D. Balla, N.G. Symeonidis [et al.] // *Int J Colorectal Dis*. – 2010. – Vol. 25. – P. 1465–1473.
25. Reichert M. Pancreatic ductal cells in development, regeneration, and neoplasia / M. Reichert, A.K. Rustgi // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2011. – Vol. 121,12. – P.4572–4578.
26. Sabaa. Ellagic acid attenuates bleomycin and cyclophosphamide-induced pulmonary toxicity in Wistar rats / Sabaa, S. Khana, S. Parvez [et al.] // *Food and Chemical Toxicology*. – 2013. – Vol. 58. – P. 210–219.
27. Ulmasov B. Differences in the Degree of Cerulein-Induced Chronic Pancreatitis in C57BL/6 Mouse Substrains Lead to New Insights in Identification of Potential Risk Factors in the Development of Chronic Pancreatitis / B. Ulmasov, K. Oshima, M.G. Rodriguez [et al.] // *The American Journal of Pathology*. – 2012. Vol. 183, 3. – P. 692–708.

Реферати

МОРФО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫС В УСЛОВИЯХ ОККЛЮЗИИ ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО ПРОТОКА

Макарчук В.А., Ушакова Г.А., Бабий А.М., Шевченко Б.Ф., Ошмянская Н.Ю.

В работе показано, что у экспериментальных крыс при кратковременной и длительной окклюзии панкреатического протока патологическое депонирование коллагена с последующим развитием фиброза органа происходит во втором случае, что подтверждается результатами компьютерной морфометрии (определение соотношения фиброзной ткани к общей площади биоптата) и биохимического анализа (определение маркеров фиброза - гиалуриновой кислоты, оксипролина белковосвязанного (ОПб/св) и оксипролина свободного (ОПсв)). Одновременно определены числовые интервалы биохимических коэффициентов КОПб/св/КОПсв для характеристики панкреатита в острой и хронической стадии при длительной окклюзии панкреатического протока: при воспалительно-некротической стадии острого панкреатита – 1,09–1,43, при атрофически-префиброзной стадии острого панкреатита – 1,44–1,78, при фиброзной стадии хронического панкреатита – 1,79 и более.

Ключевые слова: панкреатит, поджелудочная железа, окклюзия, фиброз.

MORPHO-BIOCHEMICAL FEATURES OF THE RAT'S PANCREAS UNDER CONDITIONS OF PANCREATIC DUCT OCCLUSION

Makarchuk V.A., Ushakova G.A., Babiy A.M., Shevchenko B.F., Oshmyanskaya N.Y.

We prepared 2 experimental groups: rats with short-term (group 1) and prolonged (group 2) occlusion of the pancreatic duct. Abnormal deposition of collagen with subsequent development of fibrosis in pancreas occurs in group 2, as confirmed by morphometry (ratio of fibrous tissue to the total biopsy area) and biochemical analysis (determination of fibrosis markers – hyaluronic acid, protein-bonded hydroxyproline and free hydroxyproline). Furthermore, present study defines numerical intervals of biochemical coefficients “coefficient protein-bonded hydroxyproline / coefficient free hydroxyproline”, which characteristically present in acute and chronic stages pancreatitis after prolonged pancreatic duct occlusion: inflammatory-necrotic stage of acute pancreatitis – 1,09–1,43; atrophic-profibrotic stage of acute pancreatitis – 1,44–1,78; fibrotic stage of chronic pancreatitis – 1,79 and more.

Key words: pancreatitis, pancreas, occlusion, fibrosis.

Стаття надійшла 8.01.2014 р.

Рецензент Гасюк А.П.