

Иммуноморфологическое исследование внеклеточного матрикса при хроническом панкреатите

П.Н.Никитин¹, О.В.Паклина^{1,2}, Е.Л.Туманова¹, Г.Р.Сетдикова²

¹Российский государственный медицинский университет им. Н.И.Пирогова, кафедра патологической анатомии Московского факультета, Москва

(зав. кафедрой – проф. Е.Л.Туманова);

²Клиническая больница №119 Федерального медико-биологического агентства РФ, Москва

(главный врач – проф. В.К.Агапов)

Целью исследования была характеристика коллагенов стромы поджелудочной железы при хроническом панкреатите в зависимости от степени выраженности склеротических изменений, а также анализ экспрессии матриксных металлопротеиназ, их ингибиторов, трансформирующего фактора роста $\beta 1$ и их значение в формировании фиброза при хроническом панкреатите.

Ключевые слова: хронический панкреатит, фиброз, иммуногистохимия

Immunomorphological study of extracellular matrix in chronic pancreatitis

P.N.Nikitin¹, O.V.Paklina^{1,2}, E.L.Tumanova¹, G.R.Setdikova²

¹N.I.Pirogov Russian State Medical University, Department of Pathological Anatomy of Moscow Faculty, Moscow

(Head of the Department – Prof. E.L.Tumanova);

²Clinical Hospital № 119 of Federal Medical and Biological Agency of Russian Federation, Moscow

(Chief Doctor – Prof. V.K.Agapov)

The aim of the research was to characterize the types of collagens in chronic pancreatitis depending on the severity of sclerotic changes. The authors analyzed the expression of Matrix Metalloproteinase-1,2,9, their tissue inhibitors, the transforming growth factor- $\beta 1$ and their significance in formation of fibrosis in chronic pancreatitis.

Key words: chronic pancreatitis, fibrosis, immunohistochemistry

Хронический панкреатит (ХП) – длительно текущее воспалительное заболевание поджелудочной железы (ПЖ), характеризующееся необратимыми морфологическими изменениями, типичным болевым синдромом и/или нарушением функции железы. На сегодняшний день широкий перечень возможных причин развития ХП представлен в международной классификации TIGAR-O (начальные буквы английских названий факторов риска ХП: *toxic, idiopathic, genetic, autoimmune, obstructive and recurrent acute*) [1]. Основные этиологические факторы действуют или непосредственно на ацинарные клетки

железы, вызывая их повреждение и некроз (например, алкоголь или лекарства), или способствуют повышению давления в протоках железы (желчнокаменная болезнь и др.), что приводит к внутрисекреторической активации протеолитических ферментов железы, аутолизу клеток железы, активации кининовой системы и нарушению процессов микроциркуляции, отеку.

На ранних стадиях ХП ткань железы неравномерно вовлекается в воспалительный процесс. В случаях с обструктивным панкреатитом изменения могут ограничиваться лишь частью железы, расположенной дистальнее места обструкции. Финалом течения ХП любой этиологии является склероз поджелудочной железы.

Морфологические различия обусловлены степенью выраженности воспалительных и склеротических изменений по мере прогрессирования заболевания. Макроскопически контуры железы неровные из-за неравномерного склероза паренхимы, фиброзная капсула уплотнена, число нормальных долек железы уменьшено, главный панкреатический проток деформирован за счет участков сужения и расширения просвета в зоне основного патологического процесса.

Для корреспонденции:

Паклина Оксана Владимировна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии Московского факультета Российского государственного медицинского университета им. Н.И.Пирогова, заведующая отделением патологической анатомии Клинической больницы №119 Федерального медико-биологического агентства РФ

Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

Телефон: (495) 575-6064

E-mail: okpaklina119@mail.ru

Статья поступила 13.03.2009 г., принята к печати 23.06.2010 г.

Часто формируются постнекротические псевдокисты ПЖ, заполненные тканевым детритом и гноем.

Морфологические изменения при ХП широко варьируют от одной дольки к другой. В далеко зашедших стадиях можно обнаружить одну неизмененную дольку на фоне практически разрушенной ткани поджелудочной железы. На ранних стадиях болезни меж- или перидольковый фиброз обычно клеточный, а внутридольковый едва заметный. Окруженные фиброзом междольковые протоки расширены и выстланы кубическим, иногда гиперплазированным или метаплазированным эпителием. Мелкие протоки часто деформированы и расширены с наличием в просвете эозинофильного секрета – «белковых пробок». В полях фиброза и вокруг крупных протоков имеются очаговая или диффузная инфильтрация лимфоцитами, лимфоидные фолликулы.

При ХП неалкогольной этиологии воспаление железы настолько вовлекает протоки, что в итоге становится причиной их обструкции и иногда разрушения [2]. Это объясняет нарастание свободных сывороточных белков, иммуноглобулинов и лактоферина в панкреатическом соке и возможность распространения по межклеточным пространствам, что может привести к кровотечению вследствие эрозии сосудов. Хронический панкреатит всегда сопровождается различной степенью выраженности атрофии долек с частичным или полным уменьшением зимогенных гранул в ацинарных клетках. В паренхиме из ацинарной ткани формируются «тубулярные комплексы», напоминающие пролиферирующие мелкие протоки. На поздних стадиях ХП вся ацинарная ткань железы может полностью заместиться фиброзной, и только очаговое скопление мононуклеаров указывает на разрушенную дольку или проток в этой области. При прогрессирующем коллапсе экзокринной ткани железы разные по величине эндокринные островки располагаются близко друг к другу, а также к нервным пучкам, часто отмечается гиперплазия островков поджелудочной железы или незидиобластоз. Миелинизированные нервные пучки хорошо заметны при ХП, так как имеют больший диаметр по сравнению с нервными стволами в неизмененной железе [3].

В последних исследованиях основными матрикс-продуцирующими клетками, ответственными за формирование фиброза, были названы панкреатические ретиноид-содержащие звездчатые клетки (PSC – pancreas stellate cell) [4]. Повреждение любого из участков ткани ПЖ приводит к их трансформации в миофибробласты, усиленной выработке и отложению внеклеточного матрикса, состоящего главным образом из коллагенов I и III типов [5], последующему высвобождению трансформирующего фактора роста (TGF- β 1) и нарушению активации коллагеназ [6].

Целью настоящего исследования является анализ экспрессии матриксных металлопротеиназ, их ингибиторов, TGF- β 1 и определение типов коллагена стромы железы при ХП в зависимости от степени выраженности склеротических изменений.

Материалы и методы

Работа основана на операционном материале, полученном от 97 больных, находившихся на лечении в Институте хирургии им. А.В.Вишневского Росмедтехнологий в 1997–2005 гг.

и Клинической больницы №119 ФМБА РФ в 2005–2008 гг. по поводу ХП. Среди больных мужчины составили 71%, женщины – 29%, соотношение 2,4/1. Возраст больных колебался от 20 до 96 лет, пик заболеваемости приходился на пятое десятилетие жизни.

Гистологическое исследование проводили на материале, фиксированном в нейтральном формалине, залитом в парафин. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону, применяли метод серебрения. Для иммуногистохимического исследования использовались парафиновые блоки наиболее демонстративного операционного материала от 35 больных после панкреатодуоденальной резекции. Для контроля и сравнительного анализа было исследовано 7 образцов ткани неизмененной поджелудочной железы (аутопсийный материал). Иммуногистохимическое исследование проводили стрептавидин-биотин-пероксидазным методом по схеме, рекомендуемой фирмой-производителем. Использовали первичные антитела к виментину, десмину, гладкомышечному актину, коллагену I, III и V типа, к матриксным металлопротеиназам (MMP) 1, 2 и 9 типов и их ингибиторам (TIMP) 1 и 2 типов, трансформирующему фактору роста (TGF- β 1) с применением проявочной системы LSAB2 Kits (диаминобензидин -DAB) фирмы DAKO.

Для получения цветного изображения использовали световой микроскоп «Leitz Aristoplan», сопряженный с телекамерой «Mintron» и компьютером. С каждого микропрепарата (при увеличении 200) захватывалось 3 наиболее показательных поля зрения с сохранением настроек микроскопа и камеры для более точного сравнения изображения по методике, рекомендованной Л.Э. Завалишиной и др. [7]. Обработка снимков выполнялась при помощи программы Adobe Photoshop 9.0. Площадь структур с экспрессией коллагена, десмина, виментина, MMP и TIMP рассчитывалась с помощью программы WCIF Image J. Интенсивность реакций оценивали полуколичественным методом: (-/0) – отрицательная, (+/1) – слабая, (++)/2 – средняя, (+++)/3 – интенсивная. Статистический анализ проводили при помощи программы Statistica 6.0, с вычислением среднего отклонения, коэффициента Пирсона и t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Во всех исследованных случаях фиброз паренхимы железы при ХП носил мозаичный узловый характер. По показателям площади экспрессии виментина мы разделили образцы по степени выраженности склеротических изменений на три группы (I степень – в пределах 10,00–19,99% от площади светового поля, II степень – 20,00–29,99%, III степень – 30,0%) с проведением в них сравнительного анализа экспрессии различных типов коллагена.

Площадь структур с экспрессией виментина в среднем составила 26,93%, что соответствовало площади фиброзных изменений в строме железы при окраске по Ван-Гизону. Площадь структур с экспрессией десмина и гладкомышечного актина в среднем составила 6,14% и 11,19% соответственно. При оценке иммуногистохимических реакций с виментином, десмином и гладкомышечным актином был выявлен ряд особенностей: при I степени виментин четко окрашивал соединительнотканые внутридольковые пере-

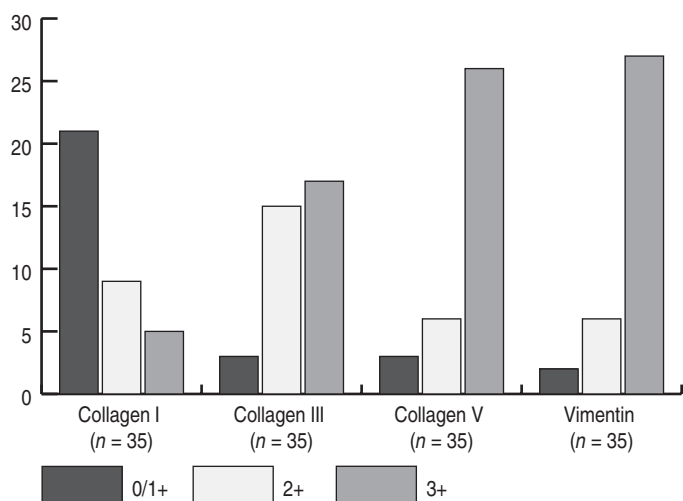


Рис. 1. Распределение по степени интенсивности экспрессии коллагенов I, III, V и виментина.

городки и середину междольковых перегородок; десмин окрашивал больше периферию междольковых перегородок и стенки сосудов; экспрессия гладкомышечного актина была только в перидуктальных и перилубулярных соединительнотканых прослойках. По мере нарастания фиброзных изменений рисунок экспрессии маркеров менялся следующим образом: экспрессия виментина нарастала, экспрессия десмина снижалась, полностью исчезая в соединительнотканых перегородках, оставаясь только в наиболее клеточных участках и стенках сосудов, гладкомышечный актин окрашивал пери- и интралубулярные перегородки кроме гиалинизированных участков ткани.

Известно, что нежная соединительнотканная строма неизменной железы содержит эмбриональный коллаген III типа [8]. При ХП соотношение и характер коллагенов стромы изменялся. Выявили, что при фиброзе I стадии в междольковых перегородках равномерно экспрессировался коллаген III и V типов (++), но в отличие от нормы интенсивность экспрессии коллагена III типа была выше. По мере прогрессирования процесса в центре междольковых фиброзных перегородок в виде узких полос появлялась экспрессия коллагена I типа (++), который формировал грубые волокна. Коллаген V типа повторял рисунок экспрессии коллагена III типа, но по интенсивности его экспрессия была выше (+++) (рис. 1). При этом прослеживалась прямая зависимость между экспрессией III и V коллагенов ($r = 0,58$; $p < 0,05$) и обратная между I и III ($r = -0,35$; $p < 0,05$), а также между I и V ($r = -0,27$; $p < 0,05$). Усиление синтеза клетками соединительнотканной стромы коллагена III типа на ранних стадиях болезни, вероятно, приводит к усилению выработки миофибробластами и фибробластами коллагенов I и V типов и постепенному замещению ими коллагена III типа от центра перегородки к периферии. Из рис. 2 видно, что в неизменной железе присутствует преимущественно коллаген III типа и незначительно V, а коллаген I типа полностью отсутствует. Присутствие коллагена V типа в выбранных нами микроскопически неизменных образцах ткани поджелудочной железы свидетельствует о первых фиброзных изменениях в железе, не видимых под микроскопом и связанных с возрастом больных.

Одновременно с синтезом коллагена происходит и его разрушение, в котором участвуют особые белки – ма-

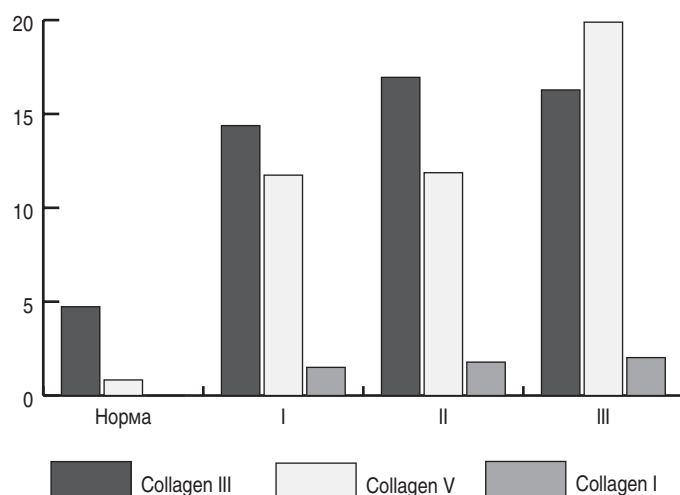


Рис. 2. Распределение коллагенов в зависимости от степени выраженности фиброза в поджелудочной железе при ХП.

триксные коллагеназы (MMP1) и желатиназы (MMP9), секретируемые фибробластами, эндотелиальными клетками, макрофагами. Активность MMP регулируется как неспецифическими, так и специфическими ингибиторами – тканевыми ингибиторами металлопротеиназ (TIMP)[9]. По данным нашего исследования в неизменной ткани ПЖ отмечалась экспрессия MMP1 ($7,89 \pm 0,47$), MMP9 ($8,37 \pm 0,47$), TIMP1 ($7,91 \pm 0,49$) и TIMP2 ($7,81 \pm 0,38$), экспрессия MMP2 отсутствовала. В ХП экспрессия металлопротеиназ была различна в зависимости от степени изменений: изменения I и II степени сопровождалось снижением уровня MMP1 ($5,97 \pm 0,47$), III – дополнительным снижением MMP9 ($7,90 \pm 0,45$). Экспрессия ингибиторов металлопротеиназ не менялась.

При этом выявились статистически значимые корреляции между экспрессией MMP1 и 9 и коллагенами III и V типов:

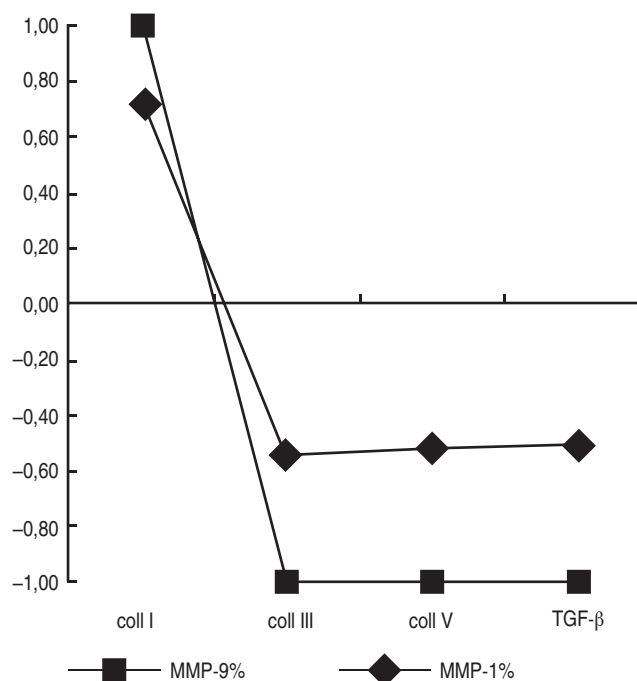


Рис. 3. Характер зависимости между экспрессией MMP1, 9, TGF-β и синтезом коллагенов I, III и V.

MMP1/MMP9 ($r = 0,70$), MMP1/Coll III ($r = -0,66$), MMP1/Coll V ($r = -0,70$), MMP9/Coll I ($r = -0,53$), MMP9/Coll V ($r = -0,65$).

Следовательно, меняющееся соотношение между металлопротеиназами и их ингибиторами также способствует отложению и смене типов коллагена в строме. Наблюдаемое нами снижение уровня MMP, вероятно, происходит также за счет увеличения экспрессии TGF- β 1, который принимает активное участие в фиброгенезе, стимулируя синтез коллагена миофибробластами и фибробластами [7], а также ингибируя активность металлопротеиназ [10]. В наших исследованиях наиболее выраженная экспрессия TGF- β 1 (+++) наблюдалась в эндокринном аппарате ПЖ, минимальная – в эпителии мелких протоков и ацинарной ткани. Известно, что TGF- β 1 проявляет высокую антипролиферативную активность в отношении эпителиальных клеток и пролиферативную активность в отношении фибробластов [11]. Поэтому выявленная высокая экспрессия TGF- β 1 клетками эндокринных островков также способствует прогрессированию фиброза при ХП. В строме ПЖ экспрессия TGF- β 1 в трех группах носила различный характер: наиболее выраженная экспрессия наблюдалась в 3-й группе TGF- β 1 ($23,58 \pm 0,99$) по сравнению со 2-й и 1-й группами TGF- β 1 ($15,05 \pm 0,98$; $5,54 \pm 1,44$ соответственно). Выявились статистически значимые корреляции между TGF- β и металлопротеиназами и, соответственно, различными типами коллагена (рис. 3):

MMP1/TGF- β 1 ($r = -0,73$), MMP9/TGF- β 1 ($r = -0,69$), Coll I /TGF- β 1 ($r = -0,35$), Coll III /TGF- β 1 ($r = 0,63$), Coll V /TGF- β 1 ($r = 0,81$).

Заключение

В морфогенезе фиброза поджелудочной железы при хроническом панкреатите большую роль играет активация звездчатых клеток железы и фибробластов в виде повышения экспрессии гладкомышечного актина. Созревание и формирование грубой рубцовой ткани в железе при ХП начинается от центра междольковых соединительнотканых перегородок и постепенно переходит на внутريدольковые пространства. Морфогенез развития фиброза при ХП носит выраженный стадийный характер. Повышение экспрессии матриксных металлопротеиназ, нарушение баланса с их ингибиторами способствует дальнейшему накоплению коллагена и снижению его деградации. После усиления синтеза коллагена и его накопления во внеклеточном матриксе происходит смена III и V типов на I. Усиление экспрессии коллагена при ХП также индуцируется трансформирующим фактором роста. Понимание механизма активации клеток, ответственных за развитие фиброза, особенно алкоголем, и изучение работы данных медиаторов может быть ключом к новым терапевти-

ческим подходам в лечении ХП и предотвращении прогрессирования склеротических изменений в железе, являющихся основной причиной выраженного болевого синдрома при ХП, требующего порой хирургического лечения.

Литература

1. Etemad B., Whitcomb D.C. Chronic pancreatitis: Diagnosis, classification, and new genetic developments // *Gastroenterology*. – 2001. – V.120. – P.682–707.
2. Bockman D.E., Muller M., Buchler M. et al. Pathological changes in pancreatic ducts from patients with chronic pancreatitis // *Int. J. Pancreatol.* – 1997. – V.21. – P.119–126.
3. Bockman D.E., Buchler M., Malfertheiner P. et al. Analysis of nerve in chronic pancreatitis // *Gastroenterology*. – 1988. – V.24. – P.1459–1469.
4. Bachem M.G., Schneider E., Gross H. et al. Identification, culture and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans // *Gastroenterology*. – 1998. – V.115(2). – P.421–432.
5. Apte M.V., Haber P.S., Darby S.J. et al. Pancreatic stellate cells are activated by pro-inflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis // *Gut*. – 1999. – V.44. – P.534–541.
6. Vaquero E., Molero X., Tian X. et al. Myofibroblast proliferation, fibrosis, and defective pancreatic repair induced by cyclosporin in rats // *Gut*. – 1999. – V. 45. – P.269–277.
7. Завалишина Л.Э., Петров А.Н., Андреева Ю.Ю. // *Арх. пат.* – 2005. – Т.67. – № 6. – С.21–24.
8. Kloppel G., *Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text 3rd Edition* 3rd edn. Williams & Wilkins. – 1998. – P.321–328.
9. Bauer K.S., Rudek M.A., Lush R.M. // *Highlights Oncol. Pract.* – 1998. – V. 16. – P.3–11.
10. Shek F.W.-T., Benyon R.C., Walker F.M. et al. Expression of transforming growth factor-1 by pancreatic stellate cells and its implications for matrix secretion and turnover in chronic pancreatitis. *Am J. Pathol.* – 2002. – V.160(5). – P.1787–1798.
11. Desmouliere A., Geinoz A., Gabbiani F. et al. Transforming growth factor- β 1 induces -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts // *J.Cell. Biol.* – 1993. – V.122. – P.103–111.

Информация об авторах:

Никитин Павел Николаевич, ассистент кафедры патологической анатомии Московского факультета Российского государственного медицинского университета им. Н.И.Пирогова
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (495) 575-6064

Туманова Елена Леонидовна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой патологической анатомии Московского факультета Российского государственного медицинского университета им. Н.И.Пирогова
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (495) 945-7754
E-mail: kafedra_patan@mail.ru

Сетдикова Галия Равильевна, научный лаборант отделения патологической анатомии Клинической больницы №119 Федерального медико-биологического агентства РФ
Адрес: 141415, Московская обл., Химкинский мкр., Новогорск, КБ №119
Телефон: (495) 575-6064
E-mail: kafedra_patan@mail.ru