

В.А. КЛОПОВА, И.В. САМСОНОВА

ВЛИЯНИЕ ВОСПАЛЕНИЯ НА ХАРАКТЕР ЭКСПРЕССИИ НЕЙРОФИЛАМЕНТА В ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПАНКРЕАТИТЕ

УО «Витебский государственный медицинский университет»,
Республика Беларусь

Цель. Изучить зависимость степени экспрессии NF (нейрофиламента) от выраженности воспалительного процесса в поджелудочной железе при хроническом панкреатите.

Материал и методы. С использованием морфологического, иммуногистохимического, морфометрического и статистического методов были исследованы кусочки поджелудочной железы 43 пациентов с хроническим панкреатитом, которым была выполнена дуоденумсохраняющая резекция ее головки. Контрольную группу составили 5 образцов поджелудочной железы умерших в результате несчастных случаев и не имеющих патологии поджелудочной железы. После проводки и окрашивания гематоксилином и эозином, по методу Ван Гизон и иммуногистохимически (NF) при увеличении $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$ оценивали изменения в поджелудочной железе, лимфоцитарную (в том числе периневральную) воспалительную инфильтрацию и характер экспрессии нейрофиламента.

Результаты. Морфологически в поджелудочной железе при хроническом панкреатите наряду с лимфоцитарной воспалительной инфильтрацией, диффузными дегенеративными и выраженными фиброзными изменениями отмечалось вовлечение нервной ткани в воспалительный процесс и ее видоизменение.

Выраженность периневрального воспаления изменялась в пределах от 0,2 до 1,714, медиана равнялась – 0,914 (0,658-1,198). При этом с увеличением выраженности воспалительной периневральной лимфоцитарной инфильтрации наблюдалась тенденция к уменьшению степени экспрессии NF – маркера зрелой и жизнеспособной нервной ткани – и процента положительно проэкспрессировавших нервных элементов.

Выявленная связь между выраженностью воспалительных изменений и уменьшением площади зрелой и жизнеспособной нервной ткани, о чем свидетельствовало изменение степени экспрессии нейрофиламента, доказывает доминирование процессов альтерации нервных элементов над репарацией в поджелудочной железе при хроническом панкреатите.

Заключение. Выявленные изменения указывают на непосредственную роль воспаления и поражения нервного компонента при хроническом панкреатите и, надо полагать, являются одним из патогенетических механизмов развития болевого синдрома у пациентов с хроническим панкреатитом и прогрессирования дегенеративных изменений в поджелудочной железе.

Ключевые слова: хронический панкреатит, нервная ткань, нейрофиламент, степень экспрессии, воспаление

Objectives. To study dependence of NF (neurofilament) expression degree on the inflammation process severity in pancreas at chronic pancreatitis.

Methods. Using morphological, immunohistochemical, morphometric and statistical methods, we investigated the pancreas tissue specimens of 43 patients with chronic pancreatitis who underwent duodenum saving resection of the head of the pancreas. Control group included 5 pancreas head specimens of people died due to by accidents and without any pathology of pancreas. After staining with hematoxylin and eosin according to Van-Gizon method as well as immunohistochemical method (NF) at $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$ magnification, we estimated changes in the pancreas, lymphocytic (including perineural) inflammatory infiltration and the character of neurofilament expression.

Results. Involvement of the nervous tissue in the inflammatory process and its changes was demonstrated morphologically combined with the lymphocytic inflammatory infiltration, diffuse degenerative and expressed fibrous changes in the pancreas at chronic pancreatitis.

Severity of perineural inflammation varied in limits from 0,2 up to 1,714, median was equal to 0,914 (0,658-1,198). At the same time with the severity increasing of the inflammatory perineural lymphocytic infiltration the tendency to reduction of the NF expression degree, a marker of expressed mature and viable nervous tissue, as well as of the percentage of positively expressed nervous elements was observed.

The revealed link between the severity of the inflammatory changes and reduction of the size of mature and viable nervous tissue, testifying to the change of neurofilament expression degree, proves the dominance of the alteration processes of the nervous elements over the reparation in the pancreas in chronic pancreatitis.

Conclusions. The revealed changes testify to the straight role of the inflammation and the nervous component affection in chronic pancreatitis and are considered to be one of the pathogenetic mechanisms of the pain syndrome development in patients with chronic pancreatitis and progressive degenerative changes in the pancreas.

Keywords: chronic pancreatitis, nerve tissue, neurofilament, inflammation

Novosti Khirurgii. 2013 Jan-Feb; Vol 21 (1): 29-35

Inflammation influence on the character of neurofilament expression in the pancreas at chronic pancreatitis

V.A. Klopova, I.V. Samsonova

Введение

Понятие «хронический панкреатит», по современным представлениям, обозначает хронический полиэтиологический воспалительно-дегенеративный процесс в поджелудочной железе, являющийся результатом воздействия активированных панкреатических ферментов на паренхиму и строму железы с перманентной деструкцией, прогрессирующей атрофией, замещением клеточных элементов паренхимы соединительной тканью, появлением псевдокист, кальцификацией железы, снижением ее экзо- и эндокринной функции [1].

Хронический панкреатит протекает фазово, с чередованием обострений и периодов ремиссии, что выражается в развитии необратимых изменений, имеющих тенденцию к прогрессированию. Последнее подразумевает не только усугубление деструктивных процессов в поджелудочной железе, но и определяет прогноз. По данным А.В. Lowenfels et al. [2], при хроническом панкреатите 10-летняя выживаемость с момента постановки диагноза составляет не более 70%, а 20-летняя — не более 45%.

Характерной гистопатологической чертой хронического панкреатита является панкреатический фиброз. На сегодняшний день механизмы развития фиброза и одного из основных клинических проявлений — болевого синдрома — изучены недостаточно. Определенный свет на патогенез фиброза проливают данные об участии в этом процессе панкреатических звездчатых клеток [3, 4, 5, 6]. В ряде исследований показано [3, 4, 5, 6], что их активация происходит в результате повышения уровня факторов роста и цитокинов, что в свою очередь является следствием повреждения ацинарных клеток, воспалительной инфильтрации лимфоцитами, плазмócитами и макрофагами, а также агрегации тромбоцитов. Панкреатические звездчатые клетки, в свою очередь, увеличивают продукцию экстрацеллюлярного матрикса и в ответ на стимуляцию IL-1 β и TNF- α продуцируют множество медиаторов, таких как, MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1), интерцеллюлярная молекула адгезии-1 и IL-8, способствующих усилению воспаления [7]. Развитие фиброза же приводит к нарастанию экзокринной и эндокринной недостаточности поджелудочной железы [8, 9].

Болевой синдром является доминирующим в клинике заболевания у 90% пациентов [10]. Наряду с интенсивной постоянной или рецидивирующей болью клиническая картина заболевания характеризуется также различного рода осложнениями со стороны как самой железы,

так и окружающих ее органов. При этом именно в связи с некупирующимся болевым синдромом 50% пациентов с хроническим панкреатитом требуется хирургическое лечение [11].

До настоящего времени этиопатогенез болевого синдрома при хроническом панкреатите остается до конца не ясным. Современная патофизиологическая концепция болевого синдрома рассматривает его возникновение как результат взаимодействия нервной и иммунной систем [12, 13]. При развитии хронического панкреатита с течением заболевания в результате воздействия панкреатических ферментов и процесса фиброобразования нервные элементы подвергаются различным изменениям их гистоструктуры, целостности, качества передачи импульсов, что в свою очередь способствует появлению панкреатической нейропатической боли. Повреждение периневрия возникает также в результате лимфоцитарной инфильтрации окружающей ткани. Кроме того, IL-1 β , NGF и TNF- α снижают порог возбудимости периферических ноцицептивных афферентов и ослабляют активность антиноцицептивной системы, а, следовательно, болевые ощущения и иммунные реакции начинают возникать на стимулы, которые ранее их не вызывали [12].

Одним из маркеров зрелых и жизнеспособных нервно-клеточных элементов является нейрофиламент (NF). В предыдущих исследованиях нами выявлена связь между увеличением площади фиброза в поджелудочной железе при хроническом панкреатите и уменьшением площади зрелой и жизнеспособной нервной ткани, о чем свидетельствовало изменение степени экспрессии нейрофиламента [14], что, надо полагать, доказывает непосредственную роль поражения нервного компонента при прогрессировании хронического панкреатита.

Надо полагать, изучение выраженности и характера воспаления в поджелудочной железе при хроническом панкреатите во взаимосвязи с фиброзными изменениями и степенью экспрессии NF позволит в дальнейшем охарактеризовать развитие нейропатии и поражение нервной ткани поджелудочной железы, определить роль поражения нервных элементов в развитии осложнений, а также расширить представления о патоморфогенезе болевого синдрома.

Цель. Изучить зависимость степени экспрессии NF (нейрофиламента) от выраженности воспалительного процесса в поджелудочной железе при хроническом панкреатите.

Материал и методы

Материалом для исследования являлись

участки поджелудочной железы пациентов с хроническим панкреатитом, которым была выполнена дуоденумсохраняющая резекция головки поджелудочной железы в ОНПЦ «Хирургия заболеваний печени и поджелудочной железы» на базе УО «Витебская областная клиническая больница». Для проведения исследования было отобрано 43 образца. Контрольную группу составили 5 образцов поджелудочной железы, полученные в морге Управления по Витебской области Государственной службы медицинских судебных экспертиз от умерших в результате несчастных случаев и не имеющих патологии поджелудочной железы.

После фиксации в 10% растворе нейтрального забуференного формалина и стандартной гистологической проводки готовили серийные срезы. Для гистологического исследования использовали следующие методы окраски: гематоксилином и эозином и по методу Ван Гизон — обзорная микроскопия, иммуногистохимическая с использованием Anti — Neurofilament Monoclonal Antibody (NF) без разведения (DAKO, Glostrup, Denmark).

При проведении исследований использовали компьютерную систему анализа изображений (микроскоп Leica DM 2000 с цифровой камерой и лицензионной программой Leica Application Suite, Version 3.6.0). С помощью световой микроскопии при увеличении $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$ оценивали изменения в поджелудочной железе, инфильтрацию лимфоцитами и периневральную воспалительную инфильтрацию.

При исследовании срезов, окрашенных моноклональными антителами к нейрофилamentу, используя увеличение $\times 100$, измеряли площадь нервных элементов и оценивали

степень их экспрессии. Результаты иммуногистохимического окрашивания оценивали полуколичественным способом по формуле: $\text{Histochemical score} = ZP(i) \times i$ (гистосчет), где i — интенсивность окрашивания, выраженная в баллах 0–3, $P(i)$ — процент элементов, окрашенных с разной интенсивностью.

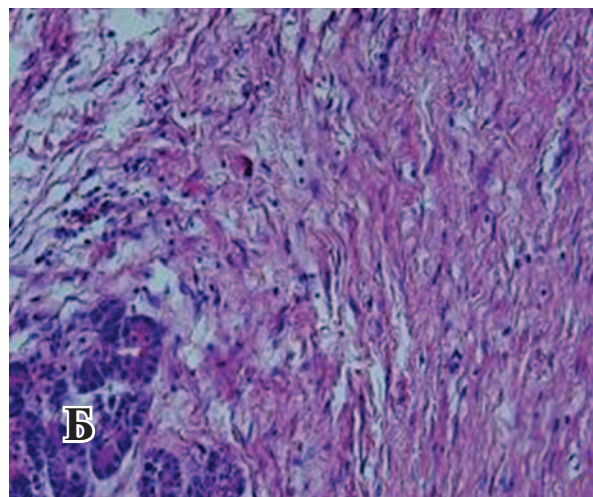
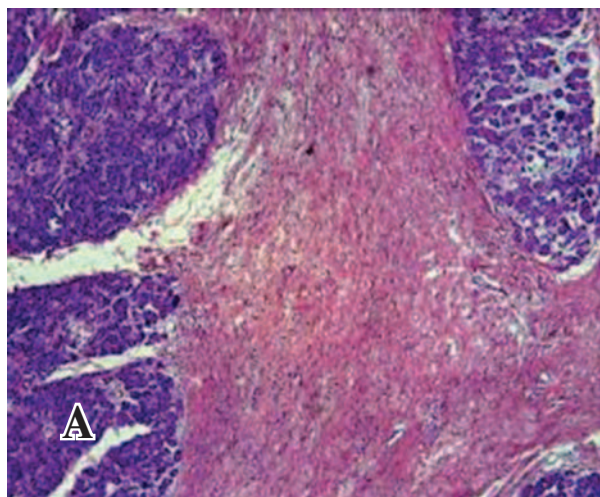
Статистическую обработку полученных данных выполняли с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0. Непараметрические количественные признаки представлены как медиана (верхняя граница 1-го квартиля выборки — верхняя граница 3-го квартиля выборки). Для оценки различий и выявления корреляционной связи применяли ранговый анализ вариаций Kruskal-Wallis и ранговую корреляцию Spearman. Критическое значение уровня значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 5% ($p < 0,05$).

Результаты

При микроскопическом исследовании в поджелудочной железе всех пациентов определялись дистрофические изменения ацинарицитов и клеток островков Лангерганса, разной степени выраженности перидуктальный и стромальный фиброз, очаговая, разной степени выраженности, преимущественно периневральная лимфоцитарная инфильтрация.

Оценка выраженности воспалительной лимфоцитарной инфильтрации в образцах поджелудочной железы, выполненная по всей площади образцов во всех полях зрения, позволила выделить 4 степени воспаления: отсутствие воспалительной инфильтрации (0), слабая (1+), умеренная (2+) и выраженная воспалительная инфильтрация (3+) (рис. 1, 2, 3).

Рис. 1. Слабая воспалительная инфильтрация (1+). Единичные разбросанные лимфоциты. Окраска гематоксилином и эозином (А — $\times 100$, Б — $\times 200$)



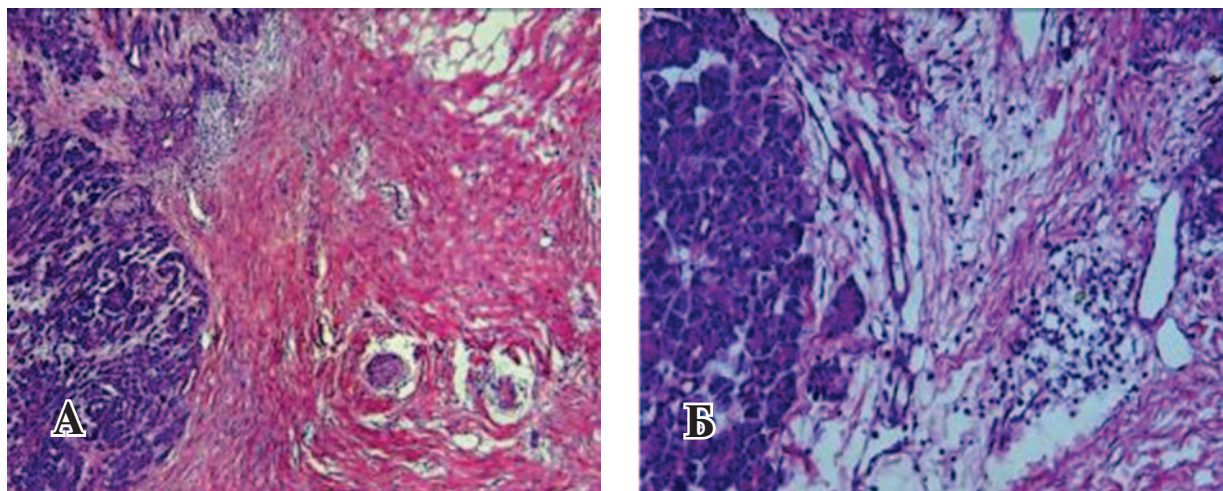


Рис. 2. Умеренная воспалительная инфильтрация (2+). Единичные разбросанные лимфоциты, мелкие и средние очаги лимфоцитарной инфильтрации. Окраска гематоксилином и эозином (А – $\times 100$, Б – $\times 200$)

Морфометрическая оценка серийных срезов, окрашенных моноклональными антителами к нейрофиламенту, показала неодинаковый уровень его экспрессии нервными элементами в образцах поджелудочной железы. Степень экспрессии NF, выраженная в баллах, варьировала от 0 до 251 баллов. Медиана степени экспрессии составила 116 (63-170) баллов. Процент положительно проэкспрессировавших нервных элементов изменялся в пределах от 0% до 100%.

Распределение образцов по группам и выраженность экспрессии NF по каждой из групп в зависимости от степени воспаления представлено в таблице.

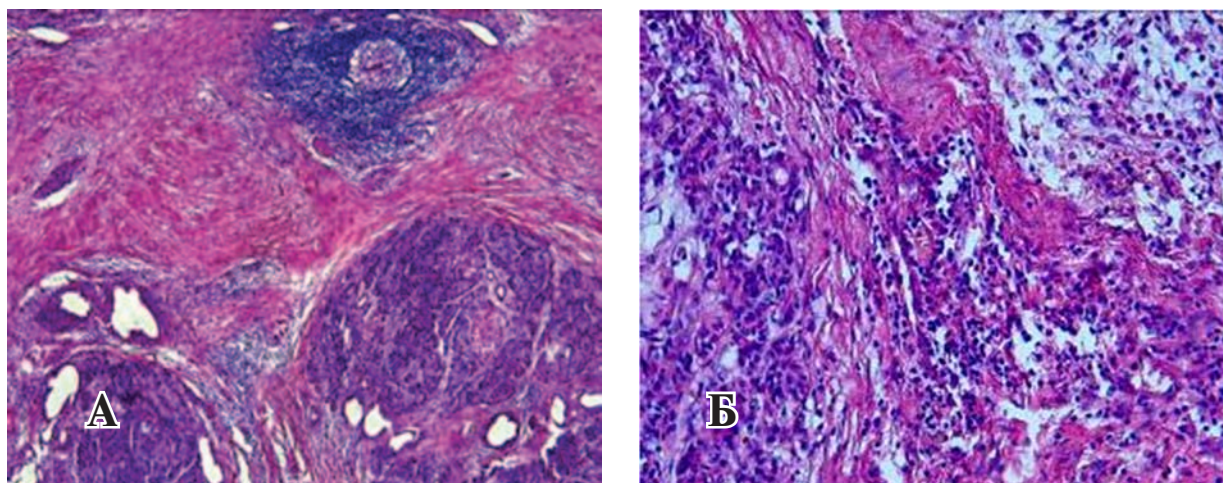
Анализируя полученные результаты, обращает на себя внимание уменьшение медианы экспрессии NF и процента положительно проэкспрессировавших нервных элементов с увеличением выраженности воспалительных

процессов в поджелудочной железе. Однако при обработке данных, с использованием рангового анализа Kruskal-Wallis, статистически значимых различий не выявлено ($p > 0,05$).

Исследование выраженности периневрального воспалительного процесса, выполненное для каждого нервного элемента в исследуемых образцах, позволило выявить 3 типа изменений, оцененных в баллах: отсутствие воспаления (0), наличие периневральной инфильтрации (1+) и интраневральная инфильтрация (2+) [13].

Статистическая обработка полученных данных показала, что выраженность периневрального воспаления изменялась в пределах от 0,2 до 1,714, медиана равнялась – 0,914 (0,658-1,198). При этом с увеличением выраженности воспалительной периневральной лимфоцитарной инфильтрации наблюдалась тенденция к уменьшению степени экспрессии NF и про-

Рис. 3. Выраженная воспалительная инфильтрация (3+). Наличие средних и крупных очагов лимфоцитарной инфильтрации, с образованием лимфоидных фолликулов, участки с диффузной инфильтрацией лимфоцитами. Окраска гематоксилином и эозином (А – $\times 100$, Б – $\times 200$)



Таблица

Оценка степени экспрессии нейрофиламента (NF) и положительно проэкспрессировавших нервных элементов в ткани поджелудочной железы больных, оперированных по поводу хронического панкреатита (Me (LQ-UQ))

Группа воспаления	Выраженность воспаления	Кол-во образцов поджелудочной железы	Степень экспрессии в группе, балл	% «+» нервных элементов
1	1+	10	179 (70-232)	92 (70-95)
2	2+	15	131 (99-163)	78 (66-90)
3	3+	18	91 (61-144)	73 (58-92)

Примечание. % «+» нервных элементов - % положительно проэкспрессировавших нервных элементов.

центра положительно проэкспрессировавших нервных элементов в образцах поджелудочной железы при хроническом панкреатите (рис. 4, 5). При обработке данных, с использованием ранговой корреляции Spearman выявлена обратная умеренная корреляционная зависимость для степени экспрессии ($r=-0,43$ $p<0,05$) и процента положительно проэкспрессировавших нервных элементов ($r=-0,33$ $p<0,05$).

Обсуждение

Выраженность воспалительных изменений в поджелудочной железе имеет первостепенное значение для определения характера и тяжести течения хронического панкреатита. Это определяется тем, что при хроническом воспалении действие провоспалительных цитокинов и активных форм кислорода способствует

Рис. 4. Слабо выраженная периневральная воспалительная инфильтрация (1) и сильная экспрессия нейрофиламента. Окраска гематоксилином и эозином (А) и Anti – Neurofilament Monoclonal Antibody (Б), ×200

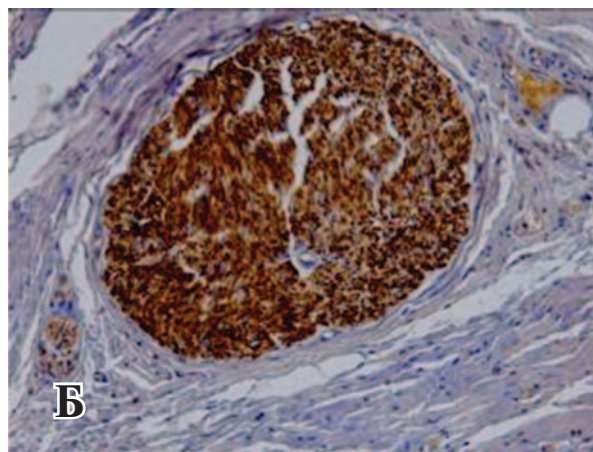
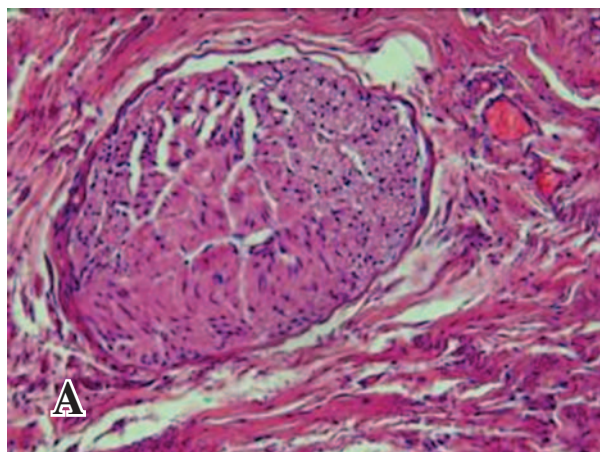
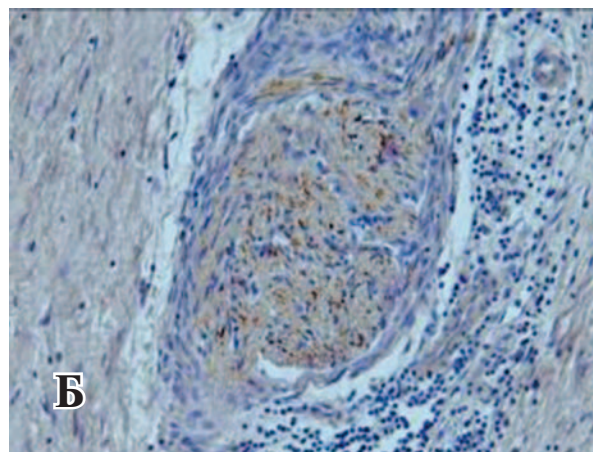
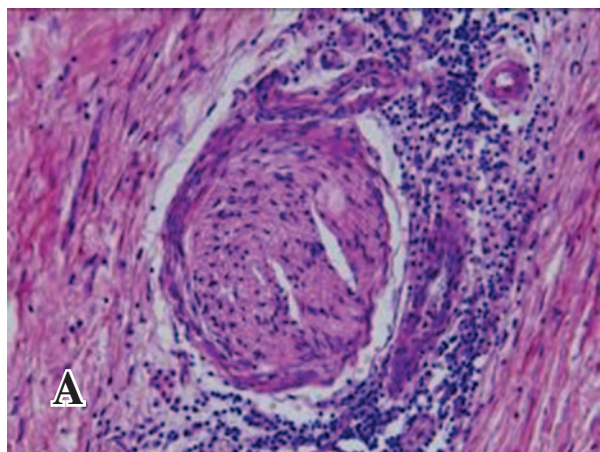


Рис. 5. Выраженная периневральная воспалительная инфильтрация (2) и слабая экспрессия нейрофиламента. Окраска гематоксилином и эозином (А) и Anti – Neurofilament Monoclonal Antibody (Б), ×200



активации клеточных защитных механизмов, в том числе регулирующих пролиферативную активность. При этом увеличение митотической активности в условиях микро среды, богатой активными формами кислорода, может способствовать образованию и накоплению клеток с ДНК-повреждениями [15].

О повреждении при хроническом панкреатите нервно-клеточных элементов в наших исследованиях свидетельствовало уменьшение площади зрелых и жизнеспособных элементов в образцах поджелудочной железы с более выраженными воспалительными изменениями. На это указывало снижение степени экспрессии нейрофиламента. Выявленная нами тенденция является, надо полагать, одним из патогенетических механизмов прогрессирования дегенеративных изменений в ткани поджелудочной железы и развития болевого синдрома у пациентов с хроническим панкреатитом.

Данные настоящего исследования согласуются с данными D.E. Vockman et al. [16], которые показали разрушение периневрия, что определяло нарушение его барьерной функции, и нервные волокна оставались незащищенными от воздействия токсических веществ и сигналов из окружающей ткани.

На корреляцию с уровня боли у пациентов с хроническим панкреатитом и степень поражения нервной ткани указывали T. Fink et al. [17]. Они показали также, что экспрессия нервами нейромодулина GAP-43 (growth-associated-protein-43), маркера нейрональной пластичности, часто сопровождалась их воспалительной инфильтрацией.

Позднее P. Di Sebastiano et al. [18], продолжая исследования T. Fink, отметили значительную роль периневрального воспаления (панкреатический неврит) в развитии болевого синдрома.

M. Büchler et al. [19], исследуя серийные срезы ткани поджелудочной железы при хроническом панкреатите, выявили повышение уровня субстанции P (SP — substance P) и кальцитонин-ген-связанный протеин (CGRP — calcitonin-gene-related-peptide) в многочисленных нервных волокнах. Так как оба пептида рассматриваются как нейротрансмиттеры боли, эти изменения обеспечивают наглядность прямого вовлечения панкреатических нервов при длительном болевом синдроме, ассоциированном с хроническим панкреатитом.

В настоящее время панкреатический неврит и нейрональную пластичность рассматривают как наиболее существенные патогенетические факторы развития болевого синдрома у пациентов с хроническим панкреатитом [13].

Заключение

Таким образом, морфологически в поджелудочной железе при хроническом панкреатите наряду с разной степени выраженности преимущественно периневральной лимфоцитарной инфильтрацией, диффузными дегенеративными и выраженными фиброзными изменениями, отмечалось вовлечение нервной ткани в воспалительный процесс и ее видоизменение, о чем свидетельствовало изменение степени экспрессии нейрофиламента — маркера зрелой и жизнеспособной нервной ткани.

С увеличением выраженности воспалительных изменений как в паренхиме железы, так и интра- и периневрально уменьшалась площадь зрелой и жизнеспособной нервной ткани, на что указывало снижение экспрессии нейрофиламента. Это доказывает преобладание процессов альтерации нервных элементов над репарацией в поджелудочной железе при хроническом панкреатите.

Выявленные изменения указывают на непосредственную роль воспаления и поражения нервного компонента при хроническом панкреатите и, надо полагать, являются одним из патогенетических механизмов развития болевого синдрома и прогрессирования дегенеративных изменений в поджелудочной железе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шалимов А. А. Хронический панкреатит. Современные концепции патогенеза, диагностики и лечения / В. В. Грубник, Д. Горовиц. — К. : Здоров'я, 2000. — С. 230.
2. International Pancreatitis Study Group / A. B. Lowenfels [et al.] // *Am J Gastroenterol.* — 1994 Sep. — Vol. 89, N 9. — P. 1467–71.
3. Organ-, inflammation- and cancer specific transcriptional fingerprints of pancreatic and hepatic stellate cells / M. Erkan [et al.] // *Molecular Cancer.* — 2010 Apr. — Vol. 23, N 9. — P. 88.
4. Shimizu K. Pancreatic stellate cells: Molecular mechanism of pancreatic fibrosis / K. Shimizu // *J Gastroenterol Hepatol.* — 2008 Mar. — Vol. 23. — Suppl. 1. — P. S119–21.
5. Role of stellate cells in pancreatic fibrogenesis associated with acute and chronic pancreatitis / M. Bachem [et al.] // *J Gastroenterol Hepatol.* — 2006 Oct. — Vol. 21. — Suppl. 3. — P. S92–6.
6. Role of Extracellular Matrix in pancreatic diseases / T. M. Gress [et al.] // *Digestion.* — 1998 Nov-Dec. — Vol. 59, N 6. — P. 625–37.
7. Masamune A. Signal transduction in pancreatic stellate cells / A. Masamune, T. Shimosegawa // *J Gastroenterol.* — 2009. — Vol. 44, N 4. — P. 249–60.
8. The different courses of early- and late-onset idiopathic and alcoholic chronic pancreatitis / P. Lacer [et al.] // *J Gastroenterol.* — 1994 Nov. — Vol. 107, N 5.

– P. 1481–87.

9. Dominguez-Muñoz J. E. Management of maldigestion in chronic pancreatitis: a practical protocol / J. E. Dominguez-Muñoz // *Clinical Pancreatolgy for Practising Gastroenterologists and Surgeons* / ed. J. E. Dominguez-Muñoz [et al.]. – Blackwell, Oxford, 2005. – P. 288–93.

10. Губергриц Н. Б. Хроническая абдоминальная боль. Панкреатическая боль: как помочь больному / Н. Б. Губергриц. – М. : ИД Медпрактика, 2005. – 176 с.

11. Long-term results of bilateral thoracoscopic splanchnicectomy in patients with chronic pancreatitis / H. C. Buscher [et al.] // *Br J Surg.* – 2002 Feb. – Vol. 89, N 2. – P. 158–62.

12. Василенко А. М. Нейроэндокринноиммунные механизмы болевых синдромов // *Боль и ее лечение.* – 2000. – № 12. – С. 4–10.

13. Fate of nerves in chronic pancreatitis: neural remodeling and pancreatic neuropathy / G.O. Ceychan [et al.] // *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* – 2010 Jun. – Vol. 24, N 3. – P. 311–22.

14. Характер экспрессии нейрофиламента в поджелудочной железе при хроническом панкреатите / В. А. Клопова [и др.] // *Новости Хирургии.* – 2012. – Т. 20, № 2. – С. 9–13.

15. Chronic pancreatitis, pancreatic adenocarcinoma

and the black box in-between / N. Jura [et al.] // *Cell Res.* – 2005 Jan. – Vol. 15, N 1. – P. 72–77.

16. Analysis of nerves in chronic pancreatitis / D. E. Bockman [et al.] // *Gastroenterology.* – 1988 Jun. – Vol. 94, N 6. – P. 1459–69.

17. Growth-associated protein-43 and protein gene-product 9.5 innervation in human pancreas: changes in chronic pancreatitis / T. Fink [et al.] // *Neuroscience.* – 1994 Nov. – Vol. 63, N 1. – P. 249–66.

18. Immune cell infiltration and growth-associated protein 43 expression correlate with pain in chronic pancreatitis / P. Di Sebastiano [et al.] // *Gastroenterology.* – 1997 May. – Vol. 112, N 5. – P. 1648–55.

19. Changes in peptidergic innervation in chronic pancreatitis / M. Büchler [et al.] // *Pancreas.* – 1992. – Vol. 7, N 2. – P. 183–92.

Адрес для корреспонденции

210023, Республика Беларусь,
г. Витебск, пр. Фрунзе, д. 27,
УО «Витебский государственный
медицинский университет»,
кафедра патологической анатомии,
тел.: +375 29 712-73-28,
e-mail: victoriya_06@tut.by,
Клопова Виктория Александровна

Сведения об авторах

Клопова В.А., аспирант кафедры патологической анатомии УО «Витебский государственный медицинский университет».

Самсонова И.В., к.м.н., доцент, заведующая кафедрой патологической анатомии УО «Витебский государственный медицинский университет».

Поступила 30.10.2012 г.