

В.А. КЛОПОВА, И.В. САМСОНОВА, А.Т. ЩАСТНЫЙ, М.И. КУГАЕВ

ХАРАКТЕР ЭКСПРЕССИИ НЕЙРОФИЛАМЕНТА В ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПАНКРЕАТИТЕ

УО «Витебский государственный медицинский университет»

Республика Беларусь

Цель. Изучить экспрессию NF (нейрофиламента) в поджелудочной железе при хроническом панкреатите, а также зависимость степени его экспрессии от выраженности фиброзных изменений.

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.

Результаты. Морфометрическая оценка показала колебание выраженности фиброзных изменений в поджелудочной железе от 10 до 98%. Степень экспрессии NF варьировала от 0 до 251 баллов и не зависела от выраженности фиброзных изменений ($p > 0,05$). Процент положительно проэкспрессировавших нервных элементов варьировал от 0% до 100%, при этом определялась тенденция к уменьшению площади зрелых и жизнеспособных элементов в образцах поджелудочной железы с более выраженными фиброзными изменениями.

Заключение. Установлено, что в поджелудочной железе при хроническом панкреатите наряду с диффузными дегенеративными изменениями паренхимы развивались выраженные фиброзные изменения и вовлекалась нервная ткань с увеличением ее суммарной площади. При этом площадь зрелой и жизнеспособной нервной ткани уменьшалась.

Ключевые слова: хронический панкреатит, фиброз поджелудочной железы, нервная ткань, нейрофиламент, степень экспрессии

Objectives. To study NF (neurofilament) expression in the pancreas tissue at chronic pancreatitis as well as the correlation of its expression degree and fibrous changes expression.

Methods. Using morphological, immunohistochemical, morphometric and statistical methods we investigated pancreas of 43 patients with chronic pancreatitis in whom duodenum-saving resection of its head had been done.

Results. Morphometric assessment revealed fibrous changes variation from 10 to 98% in pancreas at chronic pancreatitis. Degree of NF expression varied from 0 to 251 points and didn't depend on the fibrous changes expression ($p > 0,05$). Percentage of positive expressed nerve elements varied from 0 to 100, signing the decrease of mature and viable elements in pancreas specimens with more severe fibrous changes.

Conclusions. It was found out that in the pancreas at chronic pancreatitis marked fibrous changes were developing together with the diffused degenerative changes of parenchyma and the nervous tissue was involved with it total area increase. The area of mature and viable nerve tissue was decreased

Keywords: chronic pancreatitis, pancreas fibrosis, nerve tissue, neurofilament, expression degree

Введение

Термином «хронический панкреатит» обозначают группу хронических заболеваний поджелудочной железы различной этиологии, преимущественно воспалительной природы с фазопрессирующими очаговыми, сегментарными или диффузными дегенеративными или деструктивными изменениями ее экзокринной ткани, атрофией железистых элементов (панкреоцитов) и замещением их соединительной (фиброзной) тканью; изменениями в протоковой системе поджелудочной железы с образованием кист, кальцификатов и конкрементов, с различной степенью нарушений экзокринной и эндокринной функций [1].

В последнее время интерес к проблеме хронического панкреатита все больше возрастает. Это объясняется общемировой тенденци-

ей к увеличению заболеваемости данной патологией: за последние 30 лет она возросла более чем в 4 раза. Так, в Европе уровень заболеваемости хроническим панкреатитом в конце прошлого столетия колебался от 8,0 (Швейцария) до 26,4 (Франция) на 100000 населения [2]. Заболеваемость в России варьирует от 25 до 35 на 100 000 населения, при этом отмечается рост заболеваемости среди женщин и молодежи [3]. Наибольший уровень заболеваемости в мире (32,9 на 100000 населения) был зарегистрирован в Японии [4].

Отмечающийся рост заболеваемости связан не только с улучшением способов диагностики, но и с увеличением употребления алкоголя в некоторых странах, усилением воздействия неблагоприятных факторов внешней среды, которые, влияя на геном клетки, ослабляют различные защитные механизмы.

По результатам исследования С.И. Третьяка с соавт. [5], в Республике Беларусь в последние 10 лет также отмечается увеличение количества пациентов, страдающих различными формами хронического панкреатита. При этом отмечено ежегодное увеличение доли хронического панкреатита, вызванного алиментарно-токсическими факторами (алкоголь, табак, животные белки, углеводы) до 94,8%, и уменьшение доли билиарного панкреатита.

Фазовое (с чередованием обострений и периодов ремиссии) течение хронического панкреатита морфологически 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 и соавт. [6], 10-летняя выживаемость с момента постановки диагноза составляет не более 70%, а 20-летняя — не более 45%. Отмечен также рост заболеваемости раком поджелудочной железы на фоне хронического панкреатита. G. Talamini et al. [7] указывают на развитие новообразований поджелудочной железы примерно у 4% пациентов спустя 20 лет после манифестации заболевания.

Клиническая картина заболевания характеризуется интенсивной постоянной или рецидивирующей болью, причем болевой синдром является доминирующим в клинике заболевания у 90% пациентов [8]. Именно в связи с некупирующимся болевым синдромом 50% пациентам с хроническим панкреатитом требуется хирургическое лечение [9].

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. При развитии хронического панкреатита 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 перинеурия возникает также в результате лимфоцитарной инфильтрации окружающей ткани.

До сих пор остается неизвестным происхождение гипертрофированных и новообразующихся нервов, молекулярные механизмы развития болевого синдрома, а также роль центральной перестройки нервов в развитии

и поддержании абдоминальной боли. Модели хронического панкреатита на животных, несмотря на их полноценность, имеют общий недостаток: ни одна из них пока не была в состоянии показать изменения внутрипанкреатических нервов, наблюдаемые при данной патологии у человека. Кроме того, в этих моделях воспроизводились острые эпизоды воспаления, а не хроническая болезнь с постепенной перестройкой ткани [10]

Одним из маркеров зрелых и жизнеспособных нервных клеток является NF (нейрофиламент). Надо полагать, изучение экспрессии NF в нервной ткани поджелудочной железы при хроническом панкреатите позволит далее охарактеризовать развитие нейропатии и поражение нервного компонента ткани поджелудочной железы, определить роль поражения нервного компонента в развитии осложнений, а также расширить представления о патоморфогенезе болевого синдрома.

Цель — изучить экспрессию нейрофиламента (NF) в поджелудочной железе при хроническом панкреатите, а также зависимость степени его экспрессии от выраженности фиброзных изменений.

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 Витебской областной клинической больницы. Для проведения исследования было отобрано 43 образца. После фиксации в 10% растворе нейтрального забуференного формалина и стандартной гистологической проводки готовились серийные срезы. Для гистологического исследования использовались следующие методы окраски: гематоксилин и эозин, по методу Ван-Гизон — соединительная ткань, иммуногистохимическая с использованием Anti — Neurofilament Monoclonal Antibody (NF) без разведения (DAKO, Glostrup, Denmark).

С помощью световой микроскопии при увеличении $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$ оценивали изменения в поджелудочной железе. При проведении морфометрических исследований использовали компьютерную систему анализа изображений (микроскоп Leica DM 2000 с цифровой камерой и лицензионной программой Leica Application Suite, Version 3.6.0). Для оценки степени выраженности фиброзных из-

менений измеряли площадь фиброза в образце ткани поджелудочной железы в 5 случайных полях зрения при увеличении $\times 100$, площадь одного поля зрения при этом составляла 657391,700 мкм².

При исследовании срезов, окрашенных моноклональными антителами к нейрофиламенту, используя увеличение $\times 100$, измеряли площадь нервной ткани и оценивали степень его экспрессии. Результаты иммуногистохимического окрашивания оценивали полуколичественным способом по формуле: $\text{Histochemical score (гистосчет)} = ZP(i) \times i$, 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 по Краскелу-Уоллису и ранговую корреляцию по Спирмену. 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. У ча-

сти пациентов выявлялись участки некроза и кровоизлияний (рис. 1 А, Б, см. цв. вкладыш).

Морфометрическая оценка выраженности фиброзных изменений в поджелудочной железе при хроническом панкреатите показала ее колебание от 10 до 98% (рис. 2, см. цв. вкладыш). В зависимости от степени выраженности фиброзных изменений все пациенты были разделены на 3 группы: I группа – площадь фиброза составляла до 25%, II группа – площадь фиброза составляла 25-50%, III группа – площадь фиброза составляла 50% и более.

Морфометрическая оценка серийных срезов, окрашенных моноклональными антителами к нейрофиламенту, показала неодинаковый уровень его экспрессии в нервных элементах в образцах поджелудочной железы. Суммарная площадь нервной ткани колебалась от 27451,118 до 1105858,974 мкм² (медиана – 189219,477 (102247,706 – 281812,772) мкм²), при этом с увеличением степени фиброза имело место увеличение суммарной площади нервной ткани.

Суммарная площадь положительно проэкспрессировавшего нервных элементов изменялась в пределах от 0 до 1018726,155 мкм², медиана равнялась 126969,054 (57559,523 – 253010,139) мкм² (таблица).

Процент положительно проэкспрессировавших нервных элементов варьировал от 0% в третьей группе до 100% в первой группе пациентов, при этом наблюдалась тенденция к уменьшению площади зрелых и жизнеспособных элементов в образцах поджелудочной железы при хроническом панкреатите с более выраженными фиброзными изменениями. При обработке данных, используя ранговую корреляцию по Спирмену, выявлена обратная умеренная корреляционная зависимость ($r = -0,3$ $p < 0,05$).

Таблица

Оценка степени экспрессии нейрофиламента (NF) и положительно проэкспрессировавших нервных элементов в поджелудочной железе пациентов, оперированных по поводу хронического панкреатита

Группа фиброза	% фиброза в группе	Суммарная площадь нервной ткани, мкм ²	Суммарная площадь «+» нервной ткани, мкм ²	Степень экспрессии в группе, балл	% «+» нервных элементов
1	21 (10-20)	88411,386 (34533,403-163006,317)	88411,386 (27509,40-163006,317)	193 (80-245)	100 (80-100)
2	40 (30-50)	170728,963 (119075,417-81812,772)	126969,054 (74409,507-227517,729)	110 (67-170)	90 (60-90)
3	80 (60-100)	238932,547 (102247,706-90067,722)	158063,297 (29718,452-262925,005)	116 (58-159)	70 (60-90)

Примечание. Суммарная площадь «+» нервной ткани – суммарная площадь положительно проэкспрессировавших нервных элементов; % «+» нервных элементов – % положительно проэкспрессировавших нервных элементов.

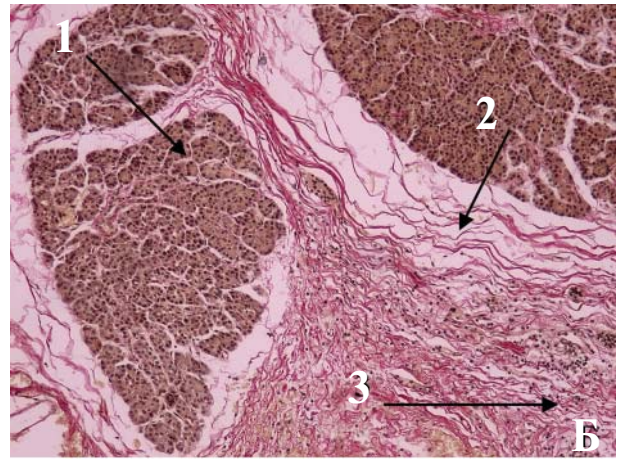
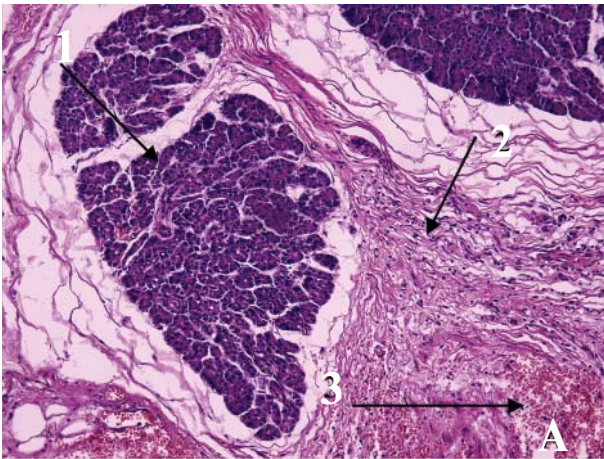


Рис. 1. (к статье В.А. Клоповой с соавт.)

Морфологические изменения в поджелудочной железе при хроническом панкреатите на серийных срезах.

Ув. $\times 200$ (А – окраска гематоксилином и эозином, Б – окраска по методу Ван Гизон, 1 – экзокринная часть, 2 – зона фиброза, 3 – кровоизлияние).

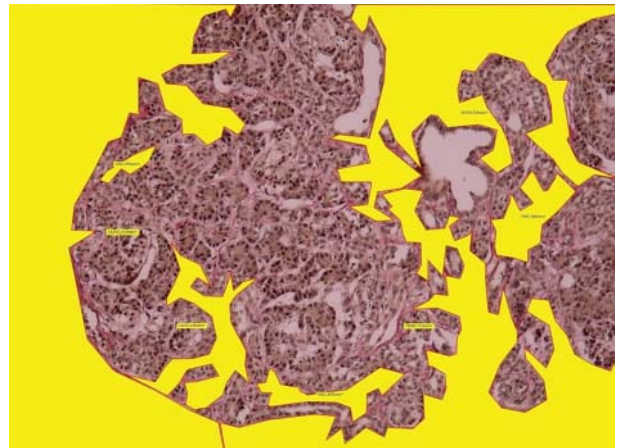
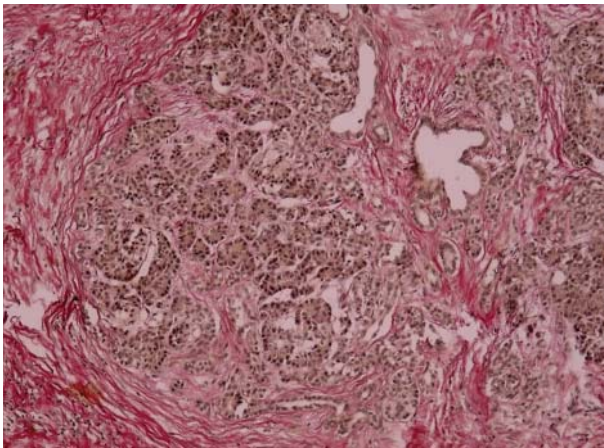


Рис. 2. (к статье В.А. Клоповой с соавт.)

Измерение площади фиброза в образцах ткани поджелудочной железы при хроническом панкреатите с использованием программы Leica Application Suite, Version 3.6.0. Окраска по методу Ван Гизон, увеличение $\times 100$ (желтым цветом отмечена площадь фиброзной ткани).

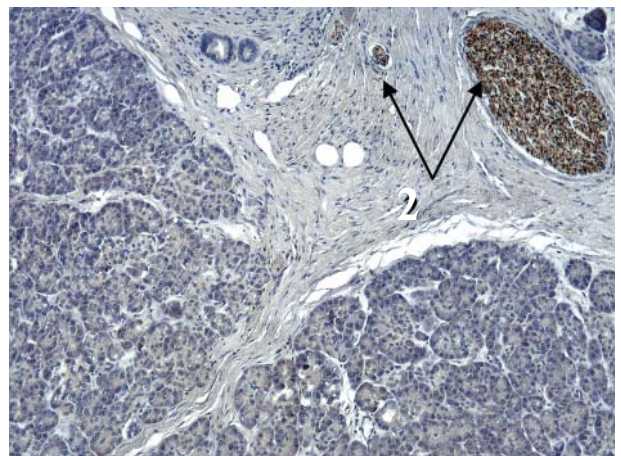
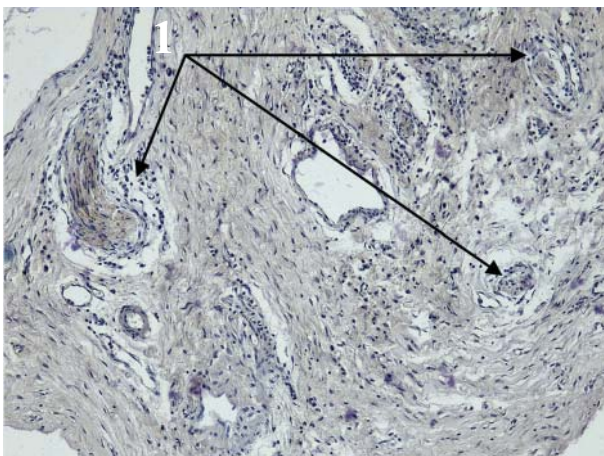


Рис. 3. (к статье В.А. Клоповой с соавт.)

Экспрессия NF нервными элементами в поджелудочной железе при хроническом панкреатите. Окраска с Anti – Neurofilament Monoclonal Antibody (1 – слабая экспрессия, 2 – выраженная экспрессия). Увеличение $\times 100$.

Исследование степени экспрессии NF, выраженной в баллах, показало значительную ее вариабельность: от 0 до 251 баллов (рис. 3, см. цв. вкладыш). Медиана степени экспрессии составила 116 (63-170) баллов. Однако сопоставление степени экспрессии с выраженностью фиброзных изменений применяя ранговый анализ вариаций по Краскелу-Уоллису и ранговую корреляцию по Спирмену никакой зависимости не обнаружило ($p > 0,05$).

Обсуждение

Выявленное в данном исследовании увеличение суммарной площади нервной ткани с увеличением степени фиброза согласуется с исследованиями D.E. Vockman et al. [11], которые показали увеличение диаметра и количества панкреатических нервных волокон при прогрессировании хронического панкреатита, а также разрушение периневрия, в результате чего нарушалась его барьерная функция и нервные волокна оставались незащищенными от воздействия токсических веществ и сигналов из окружающей ткани.

О повреждении же нервно-клеточных элементов при хроническом панкреатите в наших исследованиях свидетельствовало уменьшение в образцах поджелудочной железы с более выраженными фиброзными изменениями площади зрелых и жизнеспособных элементов. Это, надо полагать, явилось одним из патогенетических механизмов развития болевого синдрома у пациентов с хроническим панкреатитом.

Об увеличении при хроническом панкреатите нейронального протеина growth-associated-protein-43 (GAP-43), маркера нейрональной пластичности, участвующего, как известно, в развитии роста аксональных конусов и пресинаптических терминалей, сообщали T. Fink et al. Они показали, что mRNA и уровень протеина GAP-43 повышаются после нейронального повреждения. В дальнейшем была установлена прямая корреляция экспрессии GAP-43 с уровнем боли у пациентов с хроническим панкреатитом [12].

M. Büchler et al., исследуя серийные срезы ткани поджелудочной железы при хроническом панкреатите, выявил повышение уровня субстанции P (SP) и calcitonin-gene-related-peptide (CGRP) 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 [13].

В более позднем исследовании P. Di Sebastiano et al. [14] на основании измерения и сравнения уровней SP-экспрессирующего gene preprotachykinin A (PPT-A) в нормальной поджелудочной железе и при хроническом панкреатите нашли сопоставимые уровни маркера. Это позволило сделать вывод о том, что главный источник субстанции P, определяющейся во внутриорганных нервах поджелудочной железы, находится вне органа. В сочетании с этим исследованием был определен повышенный уровень neurokinin-1 (NK-1), маркера рецепторов для субстанции P, причем степень его экспрессии коррелировала с интенсивностью и частотой абдоминальной боли [15].

Выявленное нами увеличение суммарной площади нервного компонента и количества незрелых элементов является, надо полагать, следствием изменения экспрессии фактора роста нервов (NGF) и одного из его рецепторов (TrkA). О повышении экспрессии фактора роста нервов (NGF) и одного из его рецепторов (TrkA), а также его корреляции с болевым синдромом в эксперименте на животных и при исследовании послеоперационного материала головки поджелудочной железы при хроническом панкреатите указывали H. Toma et al. [16]. NGF принадлежит к семейству нейротрофина и играет роль в пролиферации нейробластов. Он может действовать как цитокин: изменять функцию тучных клеток, макрофагов и В-клеток, а также может активировать TrkA, находящийся в чувствительных и симпатических нервных волокнах, иннервирующих место воспаления. Таким образом, модулируется нейроиммунное взаимодействие. При сравнении молекулярных данных с клиническими параметрами обнаружено значительное взаимодействие между уровнем NGF мРНК, панкреатическим фиброзом и повреждением ацинарных клеток, а также между уровнем TrkA мРНК и интенсивностью боли [17].

Заключение

Таким образом, морфологически в поджелудочной железе при хроническом панкреатите наряду с диффузными дегенеративными изменениями развивались выраженные фиброзные изменения. Развитие соединительной ткани сопровождалось вовлечением нервной ткани, о чем свидетельствовало увеличение суммарной площади нервных элементов в поджелудочной железе.

Выявленная связь между увеличением площади фиброза с течением хронического

панкреатита и уменьшением площади зрелой и жизнеспособной нервной ткани, о чем свидетельствовало изменение степени экспрессии нейрофиламента, надо полагать, доказывает непосредственную роль поражения нервных элементов при прогрессировании хронического панкреатита и, возможно, является одним из патогенетических механизмов развития болевого синдрома.

ЛИТЕРАТУРА

1. Густомвсова, В. И. Применение биорезонансной терапии в комплексном лечении больных хроническим панкреатитом / В. И. Густомвсова [Электронный ресурс]. – 2009. – Режим доступа: <http://www.biorezonans.by>. – Дата доступа: 07.11.2010.
2. Epidemiology, aetiology and outcome of acute and chronic pancreatitis / В. W. M. Spanier [et al.] // *Clinical Gastroenterology*. – 2008. – Vol. 22. – P. 45-63.
3. Маев, И. В. Хронический панкреатит: учеб. пособие / И. В. Маев. – М.: ВУМНЦ, 2003. – 68 с.
4. Otsuki, M. Chronic pancreatitis in Japan: epidemiology, prognosis, diagnostic criteria, and future problems / M. Otsuki // *J. Gastroenterol.* – 2003. – Vol. 38. – P. 315-326.
5. Эпидемиология и этиология хронического панкреатита / С. И. Третьяк [и др.] // *Здравоохранение*. – 2010. – № 1. – С. 15-19.
6. International Pancreatitis Study Group / A. B. Lowenfels [et al.] // *Am. J. Gastroenterol.* – 1994. – Vol. 89. – P. 1467-1471.
7. Chronic Pancreatitis: Relationship to Acute Pancreatitis and Pancreatic Cancer / G. Talamini [et al.] // *Journal of the Pancreas*. – 2000. – Vol. 1. – P. 69-76.
8. Губергриц, Н. Б. Хроническая абдоминальная боль. Панкреатическая боль: как помочь больному / Н. Б. Губергриц. – М.: Медпрактика, 2005. – 176 с.
9. Long-term results of bilateral thoracoscopic splanch-
- nicectomy in patients with chronic pancreatitis / H. C. Buscher [et al.] // *Br. J. Surg.* – 2002. – Vol. 89. – P. 158-162.
10. Study on free radicals and pancreatic fibrosis-pancreatic fibrosis induced by repeated injections of superoxide dismutase inhibitor / N. Matsumura [et al.] // *Pancreas* – 2001. – Vol. 22. – N 1. – P. 53-57.
11. Analysis of nerves in chronic pancreatitis / D. E. Bockman [et al.] // *Gastroenterology*. – 1988. – Vol. 94. – P. 1459-1469.
12. Growth-associated protein-43 and protein gene-product 9.5 innervation in human pancreas: changes in chronic pancreatitis / T. Fink [et al.] // *Neuroscience*. – 1994. – Vol. 63. – P. 249-266.
13. Changes in peptidergic innervation in chronic pancreatitis / M. Buchler [et al.] // *Pancreas*. – 1992. – Vol. 7. – P. 183-192.
14. Expression of interleukin 8 (IL-8) and substance P in human chronic pancreatitis / P. Di Sebastiano [et al.] // *Gut*. – 2000. – Vol. 47. – P. 423-428.
15. NK-1 receptor gene expression is related to pain in chronic pancreatitis / S. V. Shrikhande [et al.] // *Pain*. – 2001. – Vol. 91. – P. 209-217.
16. Nerve growth factor expression is up-regulated in the rat model of L-arginine-induced acute pancreatitis / H. Toma [et al.] // *Gastroenterology*. – 2000. – Vol. 119. – P. 1373-1381.
17. Nerve growth factor and its high affinity receptor in chronic pancreatitis / H. Friess [et al.] // *Ann. Surg.* – 1999. – Vol. 230. – P. 615-624.

Адрес для корреспонденции

210023, Республика Беларусь,
г. Витебск, пр-т. Фрунзе, 27,
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».

Щастный А.Т., к.м.н, доцент кафедры хирургии ФПК и ПК УО «Витебский государственный медицинский университет».
Кугаев М.И., ассистент кафедры общей хирургии УО «Витебский государственный медицинский университет».

Поступила 19.12.2011 г.