

УДК 616.37–002+616.89–008.441.13+611–018.1

Особенности гибели и регенерации клеток поджелудочной железы на ранних этапах развития алкогольного хронического панкреатита

Н.Ю. Ошмянская, А.А. Галинский, Ю.А. Гайдар

ГУ «Институт гастроэнтерологии НАМН Украины», Днепрпетровск, Украина

Экспериментальный панкреатит смоделирован на 39 белых лабораторных крысах-самцах, которых разделили на группы моделирования экспериментального алкогольного панкреатита на фоне недостатка и избытка оксида азота, группу экспериментального окклюзионного панкреатита, вызванного перевязкой главного панкреатического протока, и группу контроля. С использованием гистологических и иммуногистохимических методов на максимальном увеличении светового микроскопа изучены морфологическая структура, пути гибели и регенерации островков Лангерганса, характерные для ранних этапов развития заболевания, проанализированы особенности экспрессии маркеров пролиферации PCNA и Neurogenin-3, а также описаны гистологические изменения, которые обуславливают инициацию структурных нарушений в поджелудочной железе в условиях приема алкоголя на фоне дисбаланса NO-эргической регуляторной системы, вызванного избытком и недостатком оксида азота.

Ключевые слова: хронический панкреатит; островки поджелудочной железы; PCNA; Neurogenin-3

Peculiarities of death and regeneration of pancreas cells at early stages of alcoholic chronic pancreatitis

N.Y. Oshmyanska, A.A. Galinsky, Y.A. Gaidar

State Institution "Institute of Gastroenterology of NAMS of Ukraine", Dnipropetrovsk, Ukraine

The study has been conducted on 39 white laboratory male rats which formed 5 groups: experimental occlusal pancreatitis caused by ligation of the main pancreatic duct (n = 6), experimental alcoholic pancreatitis caused by oral intake of alcohol (n = 6), against the background of an excess (n = 6) or deficiency (n = 6) of nitric oxide, as well as a control group (n = 15). This study provides the detailed description of the processes of death and regeneration in the islets of Langerhans, typical for early stages of the disease. The expression of the proliferation markers (PCNA and Neurogenin-3) has been analyzed using histological and immunohistochemical methods along with the changes of morphological structure, that led to initiation of the alcoholic chronic pancreatitis against the background of imbalance in NO-ergic regulatory system caused by an excess or deficiency of nitric oxide. It has been found that ligation of the pancreatic duct in the experiment reconstructed the circumstances of chronic pancreatitis in rats and caused the activation of fibrosis and regeneration of endocrine and exocrine tissue. Compared with occlusion, the effects of ethanol on the pancreas also manifested in the activation of fibrogenesis, but the structural changes were negligible and could unlikely lead to advanced fibrosis and chronic pancreatitis in the future. On the other side, an imbalance of NO-system in alcoholic rats leads to disruption of the zymogens secretion in the acinar cells and dilatation of the capillary network in islets. Uneven distribution of zymogen granules may lead to their intracellular activation as evidenced by the deformation of acini and focal apoptosis without inflammatory response. In this case, violation of the key adaptive responses in the pancreas makes it more vulnerable to the effects of ethanol, its metabolites, and other environmental factors, and may increase the probability of chronic pancreatitis development. At the same time, forementioned process of cell death in the pancreas is considerably more prolonged, and long term course eliminates the activation of proliferation or functional tissue regeneration.

Keywords: chronic pancreatitis; pancreatic islets; PCNA; Neurogenin-3

Введение

Хронический панкреатит (ХП) – прогрессирующее воспалительное заболевание, которое характеризуется необратимым разрушением секреторной паренхимы поджелудочной железы (ПЖ) (Тkach, 2013). За последние 30 лет отмечена общемировая тенденция к увеличению заболеваемости острым и хроническим панкреатитом более чем в два раза, с неуклонным ростом. Ежегодно впервые выявленный панкреатит регистрируют у 8,2–10,0 человек на 100 000 населения Земли. Распространенность ХП у детей составляет 9–25 случаев, у взрослых – 27,4–50,0 случаев на 100 000 населения (Mauev, 2006).

Нет никаких сомнений, что алкоголь является наиболее частым фактором, связанным с развитием ХП. Алкогольный ХП обнаруживается у людей среднего возраста (30–40 лет), чаще мужчин, уже в хроническом состоянии, и с клинической точки зрения характеризуется периодически повторяющимися приступами боли в животе. В западных странах в период с 1940 по 2003 год частота алкоголя как этиологического фактора ХП увеличилась с 19% до 50% и даже до 80% (Sarles et al., 1999).

С практической точки зрения, понимание патогенеза ХП может привести к идентификации новых молекулярных мишеней и разработке новых потенциальных терапевтических агентов. Механизм, который инициирует фиброз ПЖ, предложен Talukdar et al. (2006): окисление этанола в ацетальдегид обеспечивает активацию панкреатических стеллатных клеток (ПСК), минуя стадию преактивации; этот процесс порождает состояние окислительного стресса ПСК, который сопровождается фиброгенезом. Эта теория подразумевает, что ПСК могут быть стимулированы на ранних стадиях хронического потребления алкоголя даже в отсутствие воспаления, и функциональные изменения прогрессируют даже после прекращения потребления (Vonlaufen et al., 2014).

Важность окислительного стресса у больных хроническим панкреатитом подтверждалась также дыхательными пробами (Morselli-Labate et al., 2007). Тем не менее, хотя в соответствии с этой гипотезой спирт индуцирует фиброз ПЖ, часто появляются сообщения об отсутствии ХП при анамнезе алкоголизма. Кроме того, в экспериментальных моделях алкогольного ХП не удавалось получить картину повреждения, аналогичную той, которая наблюдается у человека. Таким образом, алкоголь представляет собой фактор риска и способен вызывать фиброз, благодаря действию на ПСК, но его роль в этиопатогенезе заболевания все еще изучена не до конца.

Материал и методы исследований

Экспериментальное исследование проводили на 39 белых лабораторных крысах-самцах (возраст – 6 месяцев, масса – 190–200 г). Крысы находились в стандартных условиях, с естественной сменой освещения и соблюдением общего рациона. У всех животных был свободный доступ к пище и воде. Экспериментальный панкреатит смоделирован четырьмя способами.

1. Лигирование главного панкреатического протока (n = 6). За 20 часов до начала эксперимента крыс в этой

группе подвергали пищевой депривации при свободном доступе к воде. Затем под наркозом (этаминал натрия, 85 мг/кг) путем хирургического вмешательства осуществляли перевязки (лигатуру) главного панкреатического протока в хвостовой части поджелудочной железы нерассасывающейся нитью «Кетгут» 3/0. Операционную рану после манипуляции зашивали послойно.

2. Пероральный прием алкоголя (n = 6) в дозе 4 мл/кг массы, один раз в сутки.

3. Пероральный прием алкоголя на фоне внутрибрюшинного введения донатора готовых молекул оксида азота (n = 6). В ходе эксперимента ежедневно, на фоне приема алкоголя по схеме из п. 2, интраперитонеально (в нижнюю часть брюшной стенки) вводили раствор нитропруссиды натрия производства «Реахим» (Украина) в субтоксической дозе (1,5 мг/кг в 2,0 мл 0,9% раствора).

4. Пероральный прием алкоголя на фоне внутрибрюшинного введения неспецифического ингибитора NO-синтазы (n = 6). В ходе эксперимента ежедневно, на фоне приема алкоголя по схеме из п. 2, интраперитонеально (в нижнюю часть брюшной стенки) вводили раствор NG-нитро-L-аргинина производства «Sigma-Aldrich» (USA) в субтоксической дозе (40 мг/кг в 2,0 мл 0,9% раствора NaCl).

Контрольную группу составили крысы, которым осуществляли только вскрытие кожного покрова на животе и сразу же его сшивали (n = 6) или внутрибрюшинно вводили 0,9% раствор NaCl (n = 9).

Через 30 суток крыс выводили разовым введением летальной дозы кетамина гидрохлорида (220 мг/кг веса), после чего выполняли декапитацию гильотиной для взятия крови. Все растворы готовили непосредственно перед введением (согласно рекомендациям производителя препаратов) и вводили животным в 9–10 часов утра.

Исследования проводили, придерживаясь нормативов Конвенции по биоэтике Совета Европы (в 1997 г.), Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных исследований, общих этических принципов экспериментов на животных, принятых законом Украины (№ 1759-VI от 15.12.2009 г.) «О защите животных от жестокого обращения».

Для выполнения гистологических исследований ПЖ отчищали от жира и лимфатических узлов. После этого 10–15% органа фиксировали в 10% растворе нейтрального забуференного формалина для последующего гистологического исследования. Биоптаты обезживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 3–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и по Маллори в модификации Слинченко.

Результаты и их обсуждение

У животных контрольной группы гистологическое строение ПЖ соответствовало норме. Экзокринные клетки, подобные друг другу по размеру и форме, формировали ацинусы, с ядрами, расположенными по периферии, и цитоплазмой, равномерно заполненной зимогенными гранулами – к центру. Выводные протоки мелкого калибра не были заметны среди ацинарной ткани;

средние и крупные протоки были окутаны небольшим количеством соединительной ткани. Эндокринные клетки встречались в островках Лангерганса разного размера, с четко очерченными краями.

После 30 суток применения классической модели ХП, построенной на лигировании ГПП, отмечалась выраженная дилатация протоков всех калибров. Расширенные протоки с зияющим просветом занимали большую часть биоптата, в протоковом эпителии отмечались признаки гиперплазии. Некоторые дольки были полностью атрофированы, другие, в которых протоковая система была поражена в меньшей степени, сохраняли часть структуры. Наблюдались ацинарные клетки в состоянии апоптоза, а также зоны роста ацинарной ткани – так называемые «ацинарные почки». Плотная фиброзная ткань была расположена вокруг протоков на месте разрушенных долек, рыхлая фиброзная ткань заполняла междольковое пространство и содержала ацинусы, островки и сосуды.

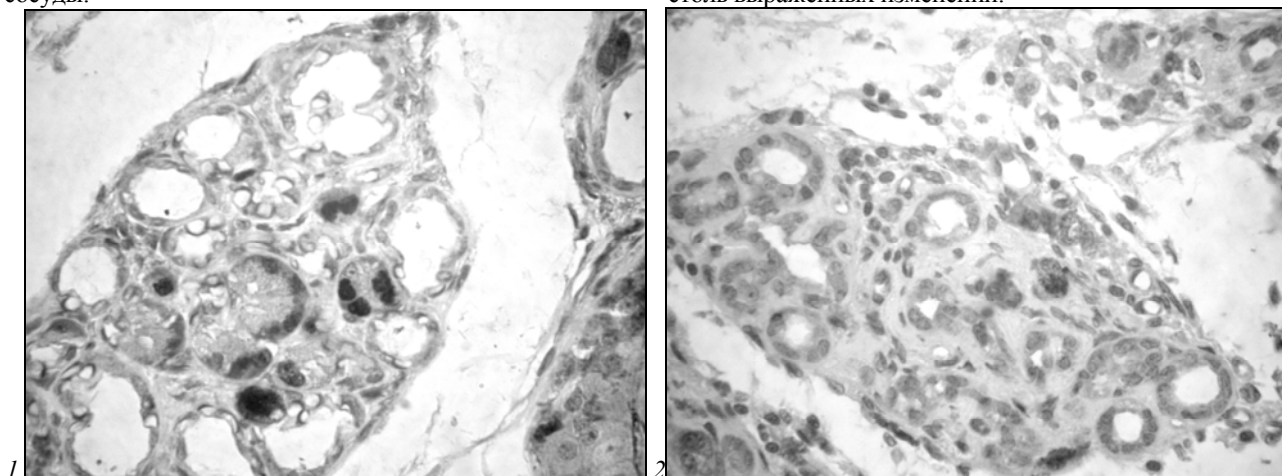


Рис. 1. ПЖ крысы с экспериментальным окклюзионным панкреатитом:

1 – рост «ацинарной почки», маркер PCNA в новообразованных ацинарных клетках, 2 – NGN3-опосредованное новообразование островков в области протоков; непрямая иммунопероксидазная реакция, увеличение $\times 200$

Ацинарное строение было преимущественно сохранено, фиброзная ткань в значительно меньших количествах расположена в перипротоковой области и не проникала внутрь долек. Воспалительная инфильтрация отсутствовала, клетки в состоянии апоптоза практически не встречались. Граница фиброзной и ацинарной ткани отличалась большей частотой митозов, но при этом менее плотным расположением клеток. Встречались островки Лангерганса всех размеров, преимущественно правильной формы.

В случае дополнительного воздействия донатором или ингибитором NO отмечалось более выраженное нарушение строения: деформация ацинусов, беспорядочное расположение ядер (рис. 2). Встречались ацинарные клетки разного размера, в том числе в состоянии митоза, а также клетки с размытыми контурами и нечетко очерченным ядром. Обращало на себя внимание неравномерное распределение зимогенных гранул в клетках. В группе крыс, получавших нитропруссид натрия, встречались клетки с избыточным накоплением зимогенов, при этом гранулы располагались более плотно и были смещены к краю клетки. Наиболее заметным нарушением накопления секрета было в группе крыс, получавших NG-нитро-L-аргинин: здесь наблюдались целые поля

При иммуногистохимическом исследовании обнаружено большое количество островков Лангерганса, состоящих преимущественно из β -клеток. Обращало на себя внимание наличие особенно крупных островков неправильной формы, расположенных среди протоков небольшого калибра и окруженных более мелкими островками, состоящими из 2–3 клеток. Подобная картина, которая не наблюдалась в группе контроля, сопровождалась активным восстановлением экзокринной и эндокринной ткани. Маркер ядерной пролиферации PCNA определялся в более чем 50% всех ацинарных и эндокринных клеток. Эмбриональный маркер Ngn3, характерный для новообразования клеток островков, встречался в единичных островках (рис. 1).

В отличие от результатов применения вышеупомянутой модели, при моделировании алкогольного панкреатита путем перорального введения алкоголя на фоне дисбаланса NO-эргической системы не наблюдалось столь выраженных изменений.

ацинарных клеток в состоянии гипосекреции, с более светлой цитоплазмой. При этом ацинусы правильной формы содержали больше зимогенных гранул, чем деформированные.

У крыс, получавших алкоголь на фоне недостатка NO, отмечались также видимые изменения капиллярной сети островков Лангерганса – расширение межклеточных пространств, выраженное кровенаполнение.

При иммуногистохимическом исследовании у крыс, принимающих этанол, не было обнаружено свидетельств повреждения или активной регенерации в островках Лангерганса, в том числе Ngn3-опосредованного новообразования эндокринных клеток, которое наблюдалось в обтурационной модели.

Моделирование острого и хронического панкреатита в эксперименте подразумевает различный набор условий и потенциальных стимулов, поэтому результаты могут значительно отличаться. С другой стороны, разные результаты получены с аналогичными моделями регенерации, что и привело к путанице. Две основные экспериментальные модели, существующие на сегодняшний день, сводятся к реконструкции двух типов развития ХП: окклюзионный и алкогольный панкреатит.

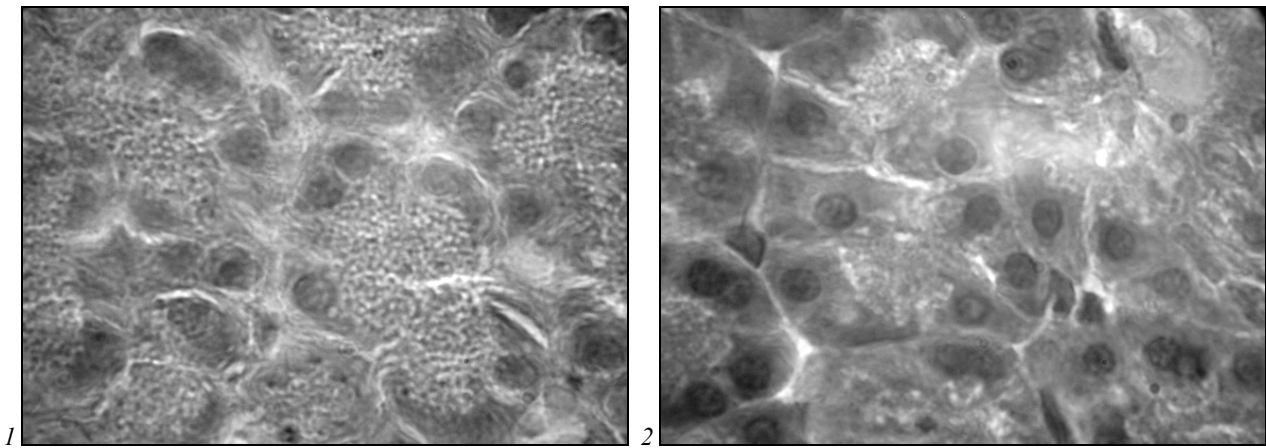


Рис. 2. Архитектура ацинусов:

1 – ПЖ крысы контрольной группы, 2 – ПЖ крысы, принимающей этанол и аргинин, деформация структуры, снижение накопления секрета; окраска гематоксилином и эозином, иммерсионный объектив, увеличение $\times 1000$

При моделировании краткосрочной окклюзии в эксперименте (использование рассасывающегося шовного материала) значительные объемы ЭЦМ откладываются в интрабулярном и периацинарном пространстве, однако приблизительно через 2 недели после индукции панкреатита гистологическая картина, масса органа и содержание коллагена возвращаются к норме (Ellenrieder et al., 2004). В клинике пациенты с окклюзионным билиарным панкреатитом после удаления конкремента также демонстрируют значительное облегчение болевого синдрома и остановку фиброобразования, в то время как при алкогольном панкреатите даже после прекращения приема алкоголя прогрессирование фиброза замедляется, но не прекращается.

Механизм, посредством которого потребление алкоголя приводит к фиброзной трансформации ПЖ, выяснен до конца, однако *in vitro* показано, что окисление этанола в ацетальдегид обеспечивает активацию ПСК, через состояние окислительного стресса, которое впоследствии активирует путь фиброгенеза (Talukdar et al., 2006). Несмотря на это, часто появляются сообщения о людях с анамнезом алкоголизма и без развития хронического панкреатита, а животные модели не могут полностью повторить картину повреждения, которая наблюдается у человека (Vonlaufen et al., 2014).

В эксперименте мы наблюдали активацию процессов фиброгенеза как при использовании обтурационной модели (перевязка ГПП нерассасывающейся нитью в течение 30 суток), так и при моделировании алкогольного панкреатита. Однако во втором случае структурные изменения в ПЖ были очень незначительными. Фиброз развивался преимущественно в перипротоковой области, и хотя на границе фиброзной и функциональной ткани наблюдалась деформация ацинусов, этот процесс практически полностью компенсировался регенерационным потенциалом ПЖ. Это подтверждает распространенную гипотезу о том, что хотя алкоголь является фактором, способствующим возникновению и развитию как острого, так и хронического панкреатита, одного этанола недостаточно для того, чтобы вызвать стойкие изменения. Высказано предположение, что этанол только «сенситизирует» клетки ПЖ, а непосредственный вред наносят дополнительные факторы, такие как курение, наследст-

венность, нарушение питания и другие (Satoh et al., 2006). Логично предположить, что ПЖ оснащена гибкой системой адаптации, которая защищает ее от внешнего воздействия, и развитие ХП является следствием нарушения в этой системе. Одной из составляющих этой системы может быть оксид азота (*NO*) – молекула с широким спектром биорегуляторного действия.

NO является жирорастворимым газом, высокоактивным и нестабильным соединением, которое образуется из L-аргинина под влиянием фермента *NO*-синтазы, легко проникает через клеточные мембраны, подвергается процессам окисления с переходом в нитриты и нитраты (Severina, 2002). *NO* действует во всех направлениях, является универсальным регулятором физиологических функций и передачи нервных импульсов, мощным периферическим вазодилататором, принимает участие в регуляции моторики и секреции. *NO* также оказывает цитопротекторное действие и является мощным медиатором воспаления, выделяясь в ответ на воздействие бактерий, вирусов, провоспалительных цитокинов (Lucas et al., 2000). Мы обнаружили, что при дисбалансе системы *NO*, вызванном приемом донатора готовых молекул *NO* натрия нитропруссидного и неспецифического ингибитора *NO*-синтаз NG-нитро-L-аргинина на фоне перорального приема алкоголя, у животных отмечается нарушение ацинарного строения ПЖ, неравномерное распределение зимогенов в ацинарных клетках и дилатация капиллярной сети островков Лангерганса. Именно интраацинарная активация трипсиногена приводит к гибели ацинарной клетки и считается ключевым событием в развитии панкреатита. Механизм этого патологического процесса до конца изучен, однако последние исследования доказывают его связь с употреблением алкоголя (Saluja et al., 2007).

Неравномерное распределение зимогенных гранул, которое отмечалось нами в моделях с дисбалансом *NO*-эргической системы, может приводить к их внутриклеточной активации и вызывать гибель клеток, что подтверждается деформацией ацинусов при отсутствии воспалительной реакции. Этот эффект, однако, характерен только для ацинарных клеток. В островках Лангерганса мы наблюдали только компенсаторное расширение капилляров, без вовлечения эндокринных клеток.

При этом процессы активного восстановления, которые наблюдаются при реализации окклюзионной модели, в том числе Ngn3-опосредованный эмбриональный путь новообразования островковых клеток, по-видимому, не задействованы при развитии алкогольного панкреатита. Это можно объяснить тем, что процесс атрофии функциональных клеток и активации ПСК в данном случае происходит слишком медленно, без участия воспаления или других факторов, оказывающих влияние на активацию регенерации.

Выводы

Лигирование протока ПЖ в эксперименте, дистально от его впадения в желчный проток, реконструирует у крыс обстоятельства ХП и вызывает активацию фиброобразования и регенерации эндокринной и экзокринной ткани. По сравнению с обтурацией, воздействие этанола на ПЖ проявляется в активации процессов фиброгенеза, при этом структурные изменения в железе крайне незначительны и вряд ли в дальнейшем могут привести к распространенному фиброзу и хроническому панкреатиту.

Дисбаланс протекторной системы *NO* на фоне приема алкоголя у крыс приводит к нарушению секреции зимогенов в ацинарных клетках и дилатации капиллярной сети островков Лангерганса. Неравномерное распределение зимогенных гранул может приводить к их внутриклеточной активации и точечной гибели клеток, подтверждением чего служит деформация ацинусов при отсутствии воспалительной реакции. В этом случае нарушение ключевых адаптивных реакций в ПЖ делает орган более уязвимым к воздействию этанола, его метаболитов и других факторов окружающей среды и может повысить вероятность развития ХП. При этом процесс отмирания клеток ПЖ протекает значительно более медленно, что исключает активацию процессов пролиферации и новообразования функциональной ткани.

Библиографические ссылки

Ellenrieder, V., Schneiderhan, W., Bachem, M., Adler, G., 2004. Fibrogenesis in the pancreas. *Rocz. Akad. Med. Bialymst.* 49, 40–46.

- Lucas, K., Pitari, G., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, K., Waldman, S., 2000. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol. Rev.* 52(3), 375–414.
- Maev, I.V., Kazjulin, A.N., Samsonov, A.A., Kucherjavij, J.A., 2006. Hronicheskij pankreatit (algoritm diagnostiki i lechebnoj taktiki). *Posobie dlja vrachej obshej praktiki, terapevtov, gastrojenterologov* [Chronic pancreatitis (diagnostic and treatment tactics). Allowance for general practitioners, internists, gastroenterologists]. GOU VUNMC MZiSR RF, Moscow (in Russian).
- Morselli-Labate, A.M., Fantini, L., Pezzilli, R., 2007. Hydrogen sulfide, nitric oxide and a molecular mass 66 u substance in the exhaled breath of chronic pancreatitis patients. *Pancreatology* 7, 497–504.
- Saluja, A., Lerch, M., Phillips, P., Dudeja, V., 2007. Why does pancreatic overstimulation cause pancreatitis? *Annu. Rev. Physiol.* 69, 249–269.
- Sarles, H., Cros, R., Bidart, J., 1979. A multicenter inquiry into the etiology of pancreatic diseases. *Digestion* 19(2), 110–125.
- Satoh, A., Gukovskaya, A., Reeve Jr, J., Shimosegawa, T., Pandol, S., 2006. Ethanol sensitizes NF-kappaB activation in pancreatic acinar cells through effects on protein kinase C-varepsilon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 291(3), 432–438.
- Severina, I.S., 2002. Oksid azota. Rol' rastvorimog guanilatciklazy v mehanizmah ego fiziologicheskikh jeffektov [Nitric oxide. The role of soluble guanylat cyclase in the mechanisms of its physiological effects]. *Voprosy Medicinskoj Himii* [Problems of Medical Chemistry] 1, 4–30 (in Russian).
- Talukdar, R., Saikia, N., Singal, D.K., Tandon, R., 2006. Chronic pancreatitis: Evolving paradigms. *Pancreatology* 6, 440–449.
- Tkach, M.N., 2013. Prakticheskie podhody k diagnostike hronicheskogo pankreatita [Practical approaches to the diagnosis of chronic pancreatitis]. *Suchasna Gastroenterologija* [Modern Gastroenterology] 69(1), 136–148 (in Russian).
- Vonlaufen, A., Spahr, L., Apte, M.V., 2014. Alcoholic pancreatitis: A tale of spirits and bacteria. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 5(2), 82–90.

Надійшла до редколегії 04.10.2014