

В.А. Туманский, И.С. Коваленко

## Тяжелый фиброз поджелудочной железы при хроническом панкреатите: основные патоморфологические составляющие, иммунофенотип фиброгенных клеток и коллагена

Запорожский государственный медицинский университет

**Ключевые слова:** хронический панкреатит, фиброз, панкреатические звездчатые клетки, коллаген I, III и IV типа.

При патоморфологическом исследовании 30 панкреатобиоптатов больных хроническим панкреатитом выделены 4 составляющие тяжелого панкреатического фиброза с учетом его локализации и ориентации коллагеновых волокон: циркулярно-перидуктальный фиброз вокруг крупных протоков железы, пластинчато-ламинарный фиброз между крупными протоками и ацинарной тканью, а также лентовидный междольковый фиброз и септально-периацинарный внутридольковый фиброз. Показано, что развитию тяжелого фиброза поджелудочной железы способствует пролиферация и увеличение количества  $\alpha$ -SMA+, виментин+, десмин+ активированных звездчатых клеток, синтезирующих избыток компонентов волокнисто-молекулярного матрикса, а также депонирование в железе значительного количества коллагена I, III и IV типов, а также фибронектина.

### Тяжкий фіброз підшлункової залози при хронічному панкреатиті: основні патоморфологічні складові, імунофенотип фіброгенних клітин і колагену

В.О. Туманський, І.С. Коваленко

При патоморфологічному дослідженні 30 панкреатобиоптатів хворих на хронічний панкреатит виділено 4 складові тяжкого панкреатичного фіброзу з урахуванням його локалізації й орієнтації колагенових волокон: циркулярно-перидуктальний фіброз навколо крупних протоків залози, пластинково-ламинарний фіброз між крупних протоків і ацинарною тканиною, а також стрічкоподібний междольковий фіброз і септально-периацинарний внутрішньодольковий фіброз. Показано, що розвитку тяжкого фіброзу підшлункової залози сприяє проліферація та збільшення кількості  $\alpha$ -SMA+, виментин+, десмин+ активованих зірчастих клітин, що синтезують надлишок компонентів волокнисто-молекулярного матриксу, а також депонування в залозі значної кількості колагену I, III і IV типів, а також фібронектину.

**Ключові слова:** хронічний панкреатит, фіброз, панкреатичні зірчасті клітини, колаген I, III та IV типу.*Патологія.* – 2013. – №1 (27). – С. 27–30

### Severe fibrosis of the pancreas in chronic pancreatitis: main pathological components, immunophenotype of fibrogenic cells and collagen

V.O. Tumanskiy, I.S. Kovalenko

Pathomorphological study of pancreas biopsies of 30 patients with chronic pancreatitis was performed and four components of severe pancreatic fibrosis according to its location and orientation of collagen fibers were identified: circular-periductal fibrosis involving the large duct of the pancreas, lamellar fibrosis between the large ducts and acinar tissue, as well as tape-like interlobular fibrosis and septal-periacinar intralobular fibrosis. It is shown that the development of severe pancreatic fibrosis is promoted by proliferation and increase of  $\alpha$ -SMA+, vimentin+, desmin+ stellate cells amount that synthesize excess components of fiber-molecular matrix, as well as depositing of significant amount of collagen I, III, IV types and fibronectin in pancreas.

**Key words:** chronic pancreatitis, fibrosis, pancreatic stellate cells, collagen I, III and IV types.*Pathologia.* 2013; №1 (27): 27–30

Патоморфологической особенностью хронического панкреатита (ХП) является развитие фиброза поджелудочной железы (ПЖ), в основе которого лежит накопление коллагена и других протеинов внеклеточного матрикса, продуцируемых активированными панкреатическими звездчатыми клетками (ПЗК). Звездчатые клетки ПЖ при ХП могут активироваться туморонекротическим фактором  $\alpha$ , интерлейкинами 1 и 8, макрофагальным воспалительным протеином-1,  $\beta_1$  трансформирующим фактором роста, фактором роста фибробластов и другими цитокинами, вызывающими увеличение подвижности и пролиферацию ПЗК, а также дифференцировку их новых поколений в звездчатые миофибробласты [4,5]. В отличие от покоящихся ПЗК, локализованных вокруг долек ПЖ и во внешнем слое стенки главного панкреатического протока [1,2], активированные ПЗК секретируют большое количество

протеинов внеклеточного матрикса, включая тубулин, фибронектин, ламинин, коллагены I, III и IV типов [6], а также протеины промежуточных филаментов, такие как десмин, глиофибрилярный кислый протеин, виментин и нестин. Известно, что 90% активированных ПЗК экспрессируют цитоскелетный  $\alpha$ -гладкомышечный актин ( $\alpha$ -SMA), поэтому  $\alpha$ -SMA используется в качестве главного маркера активированных ПЗК и звездчатых миофибробластов печени [8,9]. С учетом локализации в ПЖ выделяют интерлобулярный, интралобулярный и перидуктальный фиброз ПЖ, распространенность которого зависит от этиологических факторов и механизмов развития ХП.

#### Цель работы

Определение иммунофенотипа и пролиферативной активности панкреатических звездчатых клеток, а также основных гистотопографических составляющих

тяжелого фиброза поджелудочной железы и накопления в ней коллагена I, III и IV типа при хроническом панкреатите.

#### Материалы и методы исследования

Проведено комплексное гистологическое, гистохимическое и иммуногистохимическое исследование интраоперационных инцизионных панкреатобиоптатов у 30 больных хроническим панкреатитом в возрасте от 35 до 72 лет, а также ПЖ у 10 умерших больных без клинико-морфологических проявлений панкреатита (группа условного контроля). Для патоморфологического исследования биопсийный и секционный материал ПЖ фиксировали в забуференном 10% формалине и заливали в парафин. Основные патогистологические изменения в ПЖ определяли при микроскопии срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, гистотопографическую локализацию фиброза ПЖ оценивали в срезах, окрашенных по Ван-Гизон и Массон-триколор. В соответствии со стандартизованными протоколами в парафиновых срезах ПЖ непрямым иммунопероксидазным методом провели иммуногистохимические исследования с соответствующими первичными антителами и системой визуализации DAKO EnVision+ с диаминобензидином («ДАКО», Дания). Активированные ПЗК определяли с использованием моноклональных антител *Mo a-HuAlpha Smooth Muscle Actin, Clone 1A4* («ДАКО», Дания), для определения этими клетками экспрессии виментина применяли моноклональные антитела *Mo a-Hu Vimentin, Clone V9*, для обнаружения экспрессии десмина – моноклональные антитела *Mo a-Hu Desmin, Clone D33*. Для определения пролиферирующих ПЗК использовали моноклональные антитела *Mo a-Hu Ki-67 Antigen, Clone MIB-1* («ДАКО», Дания). Пролиферативную активность ПЗК определяли полуколичественным методом путем подсчета иммунопозитивных ядер ПЗК в 5 полях зрения микроскопа Axioplan 2 («Carl Zeiss», Германия) при увеличении  $\times 200$  (в каждом случае анализировали 200 клеток). Ядерную экспрессию Ki-67 оценивали в баллах по В. Risberg et al. (2002): 0 баллов = 0–5% ПЗК с иммунопозитивными ядрами, 1 балл = 6–25%, 2 балла = 26–50%, 3 балла = 51–75%, 4 балла = 76–100% ПЗК с иммунопозитивными ядрами. Низкому уровню экспрессии Ki-67 ПЗК соответствовали 0 и 1 балл, умеренному – 2 и 3 балла, высокому уровню экспрессии – 4 балла. Иммуногистохимическое исследование накопления фибронектина и разных типов коллагена в ПЖ проводили с использованием поликлональных антител к фибронектину *Rb a-Hu Fibronectin* (фирмы «ДАКО», Дания) и моноклональных антител к коллагену I типа, клон *RAH C11* («Имтек», Россия), к коллагену III типа, клон *RAH C33* («Имтек», Россия) и к коллагену IV типа – *Mo a-Hu Collagen IV, Clone CIV 22* («ДАКО», Дания). Морфометрические измерения площади накопления коллагена I, III и IV типа проводили в каждом биоптате ПЖ путем фотосъемки цифровой фотокамерой «Olympus 3040» (Япония) в микроскопе Axioplan 2 («Carl Zeiss», Германия) пяти полей зрения (при увеличении  $\times 200$ ) гистотопографически разных отделов ПЖ с иммуно-

позитивной экспрессией соответствующего коллагена. С использованием медицинской программы анализа и обработки цифровых изображений ImageJ, иницированной W. Rasband (1997–2012) [7], в полученных изображениях определяли площадь накапливающегося в ПЖ коллагена I, III и IV типа в условных единицах оптической плотности (УЕОП), которые представляли собой соотношение числа пикселей цифрового изображения определенного иммунопозитивного коллагена к общему числу пикселей в изображении.

#### Результаты и их обсуждение

У умерших больных 35–60 лет, не страдавших хроническим панкреатитом, при микроскопическом исследовании срезов ПЖ, окрашенных по Ван-Гизон и трехцветным методом Массона, обнаруживаются узкие прослойки малоинтенсивного фиброза вокруг крупных протоков железы, а также тонкие сегменты фиброза в междольковых соединительнотканых перегородках ацинарной ткани. Вокруг крупных и мелких протоков ПЖ, а также в междольковых прослойках соединительной ткани определяется незначительная экспрессия коллагена III типа. Коллаген IV типа входит в состав базальных мембран, окружающих ацинусы. Покоящиеся виментин-позитивные и десмин-позитивные ПЗК определяются в междольковых прослойках соединительной ткани (рис. 1, цв. вкладка 1) и вокруг крупных панкреатических протоков, экспрессия  $\alpha$ -SMA определяется в единичных междольковых и перидуктальных ПЗК. Экспрессия Ki-67 обнаруживается в ядрах единичных перидуктальных и междольковых ПЗК, незначительный уровень экспрессии Ki-67, составляющий 0 баллов, свидетельствует о низкой пролиферативной активности неактивированных звездчатых клеток. Это соответствует данным других авторов, показавших, что покоящиеся ПЗК отличает своеобразный иммунофенотип: они экспрессируют виментин, десмин, глиальные кислые протеины (GFAP), а также имеют низкую митотическую активность [3].

При патоморфологическом исследовании панкреатобиоптатов больных ХП выделены 4 составляющие тяжелого панкреатического фиброза с учетом его локализации и ориентации коллагеновых волокон: циркулярно-перидуктальный фиброз вокруг крупных протоков железы, пластинчато-ламинарный фиброз в широких фиброзных полях между крупными протоками и ацинарной тканью ПЖ, а также лентовидный междольковый фиброз и септально-периацинарный внутридольковый фиброз ПЖ.

При иммуногистохимическом исследовании установлено, что в зонах тяжелого панкреатического фиброза сосредоточено очень большое количество активированных звездчатых клеток, экспрессирующих  $\alpha$ -гладкомышечный актин, виментин и десмин (рис. 2, цв. вкладка 1). Экспрессия маркера клеточной пролиферации Ki-67 обнаружена в ядрах менее чем 25% ПЗК, что соответствует 0–1 баллу, то есть относительно низкому уровню пролиферации звездчатых клеток в зонах фиброза ПЖ. При иммуногистохимическом анализе во всех исследованных зонах

перидуктального, пластинчато-ламнарного, междолькового и внутридолькового панкреатического фиброза обнаружено значительное накопление коллагена I, III и IV типов, а также фибронектина (рис. 3, цв. вкладка 1), в избытке синтезированных активированными звездчатыми клетками.

Комплексный гистохимический и иммуногистохимический анализ показал, что морфологической особенностью тяжелого циркулярно-перидуктального фиброза ПЖ является наличие значительного концентрического фиброза преимущественно вокруг крупных панкреатических протоков. В зоне фиброза определяются очаги воспалительно-клеточной инфильтрации. При микроскопии и гистохимическом анализе вокруг крупных панкреатических протоков обнаруживается атрофия и заместительный фиброз ацинарной ткани. В толще стенки крупных протоков и в зоне перидуктального фиброза обнаруживается значительное количество  $\alpha$ -SMA-позитивных звездчатых клеток ПЖ. Активированные ПЗК экспрессируют виментин и десмин, а также в избытке продуцируют фибронектин, коллаген I, III и IV типов (рис. 4, цв. вкладка 1), о чем свидетельствуют результаты проведенного иммуногистохимического анализа. При морфометрическом сравнении площади накопления в зоне тяжелого циркулярно-перидуктального фиброза коллагенов разных типов установлено, что площадь иммунопозитивного коллагена I типа составляла  $24,09 \pm 0,92$  УЕОП, коллагена III типа –  $33,21 \pm 1,24$  УЕОП, а коллагена IV типа –  $17,78 \pm 0,84$  УЕОП.

Согласно данным специализированной литературы, циркулярно-перидуктальный фиброз ПЖ наиболее часто развивается на фоне так называемого билиарного панкреатита [3] и наблюдается в случаях холелитиаза или аномального панкреатического холедоходуктального соединения [10]. В крупных панкреатических протоках отмечается гиперплазия, метаплазия или атрофия протокового эпителия. Такой тип концентрического фиброза вокруг крупных протоков ПЖ часто сочетается с междольковым фиброзом. В ранней стадии ХП, ассоциированного с протоковой гипертензией, развивается очаговый фиброз стенки главного панкреатического протока, в дальнейшем формируются концентрические перидуктальные фиброзные расширения (фиброзные «муфты») с развитием фокального стеноза протока [11].

Гистотопографической составляющей тяжелого панкреатического фиброза при ХП является пластинчато-ламнарный фиброз ПЖ, который морфологически характеризуется образованием широких пластинчатых фиброзных полей с параллельно ориентированными коллагеновыми волокнами. Обычно широкие пластинчатые фиброзные поля отделяют крупные протоки ПЖ от ацинарной ткани. Можно предположить, что расширение таких пластинчато-ламнарных фиброзных полей способствует постепенной атрофии прилегающей ацинарной ткани ПЖ.

При параллельном гистохимическом и иммуногистохимическом анализе в пластинчато-лентовидных фиброзных полях обнаруживается большое число продольно ориентированных ПЗК, экспрессирующих  $\alpha$ -SMA, виментин и десмин, а также массивные отложения фибронектина и параллельно ориентированных коллагеновых волокон I, III и IV типов (рис. 5, цв. вкладка 1).

При сравнительном морфометрическом исследовании площади накопления коллагена I, III и IV типов установлено, что в зонах пластинчато-ламнарного фиброза ПЖ иммунопозитивный коллаген I типа составлял  $24,09 \pm 0,72$  УЕОП, коллаген III типа –  $22,68 \pm 0,54$  УЕОП, коллаген IV типа –  $15,34 \pm 1,15$  УЕОП.

Диффузно распространенный тяжелый междольковый фиброз ПЖ характеризуется значительным расширением междольковых септ, которые в гистологических срезах представляют собой неравномерно расширенные фиброзные ленты, охватывающие большинство долек ПЖ. При иммуногистохимическом исследовании в расширенных междольковых фиброзных лентах обнаруживается повышенное количество  $\alpha$ -SMA-позитивных звездчатых клеток, экспрессирующих виментин и десмин, а также значительное количество фибронектина и коллагеновых волокон I, III и IV типов. С учетом данных специализированной литературы можно предполагать, что такой тип фиброза начинается с мозаично распределенных локусов междолькового фиброза, которые на ранних стадиях обнаруживаются между немногочисленными дольками или группами долек с ацинусами обычной структуры. Мозаично распространенный междольковый фиброз ПЖ характерен для ранней стадии ХП алкогольной этиологии, а также развивается при обструкции главного панкреатического протока [9]. Прогрессирование такого вида фиброза ведет к формированию диффузно распространенного междолькового фиброза ПЖ, охватывающего множество долек, а также к параллельному развитию интрадолькового фиброза [12].

По данным проведенных исследований, диффузно распространенный междольковый фиброз, охватывающий большую часть долек ПЖ, обычно сочетается с внутридольковым септально-периацинарным фиброзом ПЖ, который характеризуется наличием в дольках фиброзных септ разной толщины, а также участков концентрического периацинарного фиброза. При тяжелом внутридольковом фиброзе в дольках обнаруживаются замурованные в фиброзную ткань панкреатические ацинусы с атрофичными ацинарными клетками, содержащие протоковый эпителий и тубулярные комплексы, толстостенные кровеносные сосуды и нервные стволы. В толще фиброзных септ, а также вокруг междольковых и мелких внутридольковых протоков наблюдается диффузная или очаговая воспалительно-клеточная инфильтрация. В непосредственной близости с протоками можно наблюдать большие «аденоматоидные» скопления из сохранившихся панкреатических островков.

При иммуногистохимическом исследовании в зонах тяжелого диффузно распространенного лентовидного междолькового фиброза и септально-периацинарного внутридолькового фиброза обнаруживается повышенное количество активированных  $\alpha$ -SMA-позитивных ПЗК, а также значительное накопление фибронектина, коллагена I, III и IV типов (рис. 6, цв. вкладка 1). Активированные ПЗК экспрессируют не только  $\alpha$ -SMA, но также виментин и десмин. Морфометрическое сравнение площади, занимаемой в зонах междолькового и внутридолькового фиброза, накопившимися коллагенами разного типа показало, что площадь депонированного коллагена I типа составила  $20,48 \pm 0,98$  УЕОП, коллагена III типа –  $25,04 \pm 0,71$  УЕОП, а коллагена IV типа –  $18,70 \pm 0,86$  УЕОП.

Таким образом, проведенные исследования показали, что в отличие от нормальной ПЖ, которая содержит небольшое количество фибриллярного коллагена III типа в междольковых септах, в стенках крупных и мелких протоков, небольшое количество коллагена IV типа в составе периацинарных базальных мембран [13], при развитии ХП и панкреатического фиброза усиливается синтез активированными ПЗК и накопление в ПЖ преимущественно фибриллярных коллагенов I и III типа, а также увеличивается синтез и накопление коллагена IV типа. По мнению S.D. Friedman [14], в развитии цирротических изменений в печени и в поджелудочной железе значительную роль играет депонирование фибриллярного коллагена I типа, который не определяется в нормальной поджелудочной железе и относится к фибриллообразующим коллагенам и обнаруживается преимущественно в склеротически измененной и рубцовой ткани.

#### Выводы

1. Результаты комплексного гистологического, гистохимического и иммуногистохимического исследования ПЖ у больных хроническим панкреатитом позволили идентифицировать при тяжелом панкреатическом фиброзе циркулярно-перидуктальный фиброз вокруг крупных протоков железы, пластинчато-ламинарный фиброз в широких фиброзных полях между крупными протоками и ацинарной тканью железы, а также лентовидный междольковый фиброз и септально-периацинарный внутридольковый фиброз ПЖ.

2. Установлено, что развитию тяжелого фиброза ПЖ способствует пролиферация и увеличение количества  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>, виментин<sup>+</sup>, десмин<sup>+</sup> активированных звездчатых клеток, синтезирующих избыток компонентов волокнисто-молекулярного матрикса, а также депонирование в железе значительного количества коллагена I, III и IV типов и фибронектина.

3. Морфологическим проявлением тяжелого циркулярно-перидуктального фиброза ПЖ является наличие значительного концентрического фиброза вокруг крупных протоков железы с атрофией и заместительным фиброзом ацинарной ткани вокруг протоков, а также наличие воспалительно-клеточной инфильтрации в зоне фиброза. В стенке крупных протоков и в зоне перидуктального фиброза выявляется большое количество  $\alpha$ -SMA-позитивных ПЗК, а также значительное депонирование коллагена: при морфометрии площадь накопления коллагена I типа составила 24,09±0,92 УЕОП, коллагена III типа – 33,21±1,24 УЕОП, коллагена IV типа – 17,78±0,84 УЕОП.

4. Патоморфологическими признаками тяжелого пластинчато-ламинарного фиброза является наличие широких фиброзных полей между крупными протоками ПЖ и ацинарной тканью, содержащих большое количество  $\alpha$ -SMA-позитивных звездчатых клеток, а также депонированного коллагена. По данным морфометрии площадь накопления коллагена I типа в полях пластинчато-ламинарного фиброза составила 24,09±0,72 УЕОП, коллагена III типа – 22,68±0,54 УЕОП, коллагена IV типа – 15,34±1,15 УЕОП.

5. Морфологическими проявлениями тяжелого панкреатического междолькового и внутридолькового фиброза является наличие диффузно распространенного лентовидного междолькового фиброза, охватывающего большинство долек, а также септально-периацинарного внутридолькового фиброза с атрофией ацинусов и перестройкой долек ПЖ. В этих зонах определяется увеличенное количество активированных  $\alpha$ -SMA-позитивных ПЗК и выраженное депонирование коллагена: определяемая при морфометрии площадь накопления коллагена I типа составила 20,48±0,98 УЕОП, коллагена III типа – 25,04±0,71 УЕОП, коллагена IV типа – 18,70±0,86 УЕОП.

#### Список литературы

1. Morphological and immunocytochemical identification of periacinar fibroblast-like cells derived from human pancreatic acini / T. Saotome, H. Inoue, M. Fujimiya [et al.] // *Pancreas* – 1997. – Vol. 14. – P. 373–382.
2. Suda K. *Pancreas – Pathological Practice and Research* / K. Suda – Tokyo: Karger, 2007. – 318 p.
3. Fibrogenesis of the pancreas: the role of stellate cells / M.G. Bachem, Sh. Zhou, W.Schneiderhan, M.Siech // In: *The pancreas: An integrated textbook of basic science, medicine and surgery*. Second ed. / Ed. by H. Beger, A. Warshaw, M. Buchler et al. – Blackwell Publishing Limited, 2008. – P. 383–503.
4. Pancreatic stellate cells and their role in fibrogenesis / M.G. Bachem, A. Schmid-Kotsas, M. Siech et al. // In: *Pancreatic Disease*. / Ed. by C.D. Johnson, C W. Imrie. – London, Springer, 2004. – P. 227–239.
5. Mews P. Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis. P. Mews, P. Phillips, R. Fahmy et al. // *Gut*. – 2002. – Vol. 50. – P. 535–541.
6. Jaster R. Molecular regulation of pancreatic stellate cell function / R. Jaster // *Mol. Cancer*. – 2004. – Vol. 3. – P. 26–32.
7. Rasband W.S. Image J, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. – <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2012.
8. Pancreatic ductal myofibroblasts - proliferative patterns in various pathological situations / Izumi M., Suda K., Torii A. et al. // *Virchows Arch*. – 2001. – Vol. 438. – P. 442–450.
9. Histopathologic and immunohistochemical studies on the mechanism of interlobular fibrosis of the pancreas / K. Suda, M. Takase, K. Takei et al. // *Arch Pathol Lab Med* – 2000. – Vol. 124. – P. 1302–1305.
10.  $\alpha$ -Smooth muscle actin immunoreactivity may change in nature in interlobular fibrosis of the pancreas in patients with congenital biliary dilatation / K. Matsubara, K. Suda, F. Suzuki et al. // *Pathol Int*. – 2004. – Vol. 54. – P. 498–502.
11. *The pancreas: An integrated textbook of basic science, medicine, and surgery*, second edition. / H. Beger, A. Warshaw, M. Buchler et al. – Blackwell Publishing, Inc., Malden, Massachusetts, 2008. – 1006 p.
12. Histopathologic and immunohistochemical studies on alcohol pancreatitis and chronic obstructive pancreatitis: special emphasis on ductal obstruction and genesis of pancreatitis / Suda K., Mogaki M., Oyama T. et al. // *Am J Gastroenterol*. – 1990. – Vol. 85. – P. 271–276.
13. Ricard-Blum S. The Collagen Family / S. Ricard-Blum // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. – 2011. – Vol. 3(1). – a004978.
14. Friedman S.D. The cellular basis of hepatic fibrosis / S.D. Friedman // *N Engl J Med*. – 1993. – Vol. 328. – P. 1828–1835.

#### Сведения об авторах:

Туманский В.А., д. мед. н., профессор, зав. каф. патологической анатомии и судебной медицины с основами права ЗГМУ, директор Института клинической патологии человека.

Коваленко И.С., ассистент каф. патологической анатомии и судебной медицины с основами права ЗГМУ.

Надійшла в редакцію 14.03.2013 р.