

УДК 542.978:616.37—089.87:616—085

ИНГИБИРОВАНИЕ ЗВЕЗДЧАТЫХ КЛЕТОК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЛИЗИНОПРИЛОМ И ЛОВАСТАТИНОМ ДЛЯ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ ФИБРОЗА ЕЕ КУЛЬТЫ ПОСЛЕ ДИСТАЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ В МОДЕЛИ ХРОНИЧЕСКОГО АЛКОГОЛЬНОГО ПАНКРЕАТИТА

М. Е. Ничитайло, Д. А. Кравченко, И. С. Шпонька, Е. Б. Медвецкий, И. М. Савицкая, И. И. Булик, Ю. А. Хилько

Национальный институт хирургии и трансплантологии имени А. А. Шалимова НАМН Украины, г. Киев, Днепротетровская медицинская академия МЗ Украины

INHIBITION OF THE STELLATE CELLS USING LISINOPRIL AND LOVASTATIN FOR PROPHYLAXIS OF PANCREATIC STUMP FIBROSIS AFTER PERFORMANCE OF DISTAL RESECTION IN A MODEL OF CHRONIC ALCOHOLIC PANCREATITIS

M. E. Nichitaylo, D. A. Kravchenko, I. S. Shpobnka, E. B. Medvetskiy, I. M. Savitskaya, I. I. Bulik, Yu. A. Khiblko

РЕФЕРАТ

Комплексное применение лизиноприла (ингибитора ангиотензин—превращающего фермента) и ловастатина (ингибитора HMG—CoA редуктазы) замедляет фиброз в поджелудочной железе (ПЖ) у крыс при алкогольном хроническом панкреатите (ХП) после ее дистальной резекции. Лизиноприл и ловастатин вводили крысам после дистальной резекции ПЖ в дозе 10 мг/кг в течение 3 нед. Для оценки влияния терапии на активность и количество звездчатых клеток (ЗК) ПЖ определяли иммуногистохимические (ИГХ) маркеры: α —гладкомышечный актин (α —SMA), десмин, глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), виментин, изучали экспрессию матриксной металлопротеиназы—1 (MMP—1) и ингибитора матриксной металлопротеиназы—2 (TIMP—2). Под влиянием лизиноприла и ловастатина снижалась активность ЗК ПЖ, экспрессия SMA, десмина, GFAP, виментина и TIMP—2, значительно увеличивалось соотношение MMP—1 и TIMP—2, достоверно уменьшалась выраженность фиброзного поражения ПЖ по сравнению с таковой в контрольной группе.

Ключевые слова: поджелудочная железа; хронический панкреатит; звездчатые клетки; лизиноприл; ловастатин; эксперимент.

SUMMARY

Complex application of lisinopril (inhibitor of angiotensin—converting enzyme) and lovastatin (inhibitor of HMG—CoA reductase) inhibits pancreatic fibrosis in the rats, having alcoholic chronic pancreatitis after distal pancreatic resection (DPR). Lisinopril and lovastatin were injected to the rats after DPR in dose 10 mg/kg during 3 weeks. Immunohistochemical markers, such as α —smooth-muscle actin (α —SMA), desmin, glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin, and expression of matrix metalloproteinase—1 (MMP—1) as well as inhibitor of matrix metalloproteinase—2 (TIMP—2) were detected for estimation of therapeutic impact on activity and quantity of stellate pancreatic cells. Under the influence of lisinopril and lovastatin there were observed lowering in the stellate pancreatic cells activity and in expression of SMA, desmin, GFAP, vimentin and TIMP—2, the MMP—1 and TIMP—2 ratio have had increased significantly and severity of fibrotic pancreatic affection had reduced trustworthily in comparison with such, occurring in a control group.

Key words: pancreatic gland; chronic pancreatitis; stellate cells; lisinopril; lovastatin; experiment.

Хирургическое лечение ХП является сложной, противоречивой проблемой. Прогрессирующую недостаточность экзокринной и эндокринной функций ПЖ после операции связывают больше с фиброзом ПЖ, чем с недостатками оперативного лечения с использованием различных методов [1, 2]. ЗК ПЖ играют ключевую роль в формировании фиброзных изменений в органе при ХП.

В активном (миофибробластном) состоянии эти клетки синтезируют белки экстрацеллюлярного матрикса, что обуславливает фиброзные изменения ПЖ, а также выделяют факторы, которые аутокринно поддерживают активное состояние клетки, что способствует прогрессированию фиброза ПЖ даже после прекращения действия панкреатит—провоцирующих факторов. Активное состояние ЗК ПЖ характеризуется синтезом α —SMA, GFAP, коллагена I и III типа, десмина, виментина, металлопротеиназ (MMP—1, MMP—2) тканевых ингибиторов металлопротеиназ (TIMP—1, TIMP—2), а также протеогликанов и гиалуроновой кислоты. Терапия, направленная на подавление активности ЗК ПЖ, является перспективным направлением в лечении фиброза ПЖ.

В культуре ЗК ПЖ ангиотензин II непосредственно активирует их: повышает экспрессию α —SMA, пролиферативную активность, поэтому блокирование ренин—ангиотензиновой системы (РАС) патогенетически оправданно в замедлении фиброзных изменений ПЖ. Применение лизиноприла в эксперименте у крыс уменьшало количество TGF— β 1, фактора некроза опухолей (TNF— α), рецепторов PDGF— β , количество клеток, выделяющих α —SMA, замедляло фиброз ПЖ [3—5].

Применение ингибиторов HMG—CoA редуктазы, группы статинов может быть перспективным направлением в лечении ХП благодаря уменьшению содержания мевалоната и других промежуточных продуктов синтеза холестерина, влияющих на многие внутриклеточные сигнальные пути (Ras, Rho, Rac), воздействию на различные клеточные системы, включая ЗК ПЖ.

Статины уменьшают выделение вазоконстрикторов, в частности, эндотелина I, ангиотензина II у животных, обладают выраженными антиоксидантными свойствами [6]. В культуре ЗК ПЖ крысы ловастатин ингибировал пролиферацию активных клеток, уменьшая экспрессию α -SMA; при концентрации препарата выше уровня подавления роста значительно увеличивалась апоптозная активность клеток. На молекулярном уровне это ингибирует Raf—Ras ERK путь [7, 8].

Цель исследования: разработка и обоснование патогенетической консервативной терапии, направленной на уменьшение фиброзного поражения культуры ПЖ после ее резекции по поводу алкогольного ХП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводены в отделе экспериментальной хирургии на 71 крысе породы Wistar — самках, массой тела 230—390 г. Эксперименты соответствовали требованиям Закона Украины (№ 1759—VI от 15.12.09) "О защите животных от жестокого обращения". Создана энтеральная модель алкогольного ХП по методике М. Nakagami и соавторов [9].

У выживших 68 животных с алкогольным ХП выполняли дистальную резекцию ПЖ с последующим ИГХ исследованием биопсийного материала.

После операции крысы рандомизированы на 6 групп для последующего консервативного лечения в течение 21 сут. В статье представлены сравнительные данные животных 4 групп: контрольной (n=12), 9 крыс, которым вводили лизиноприл 10 мг/кг, 9 крыс, которым вводили ловастатин 10 мг/кг, 9 крыс, которым проведена комплексная терапия (лизиноприл 10 мг/кг и ловастатин 10 мг/кг).

На 22—е сутки выполняли эвтаназию животных путем передозировки 10% раствора тиопентал—натрия, забирали ПЖ для исследования.

Для ИГХ исследования применяли непрямой иммунопероксидазный метод со сверхчувствительной системой визуализации UltraVision Quanto (LabVision), определяли активированные ЗК ПЖ с использованием моноклональных антител к α -SMA, GFAP, виментину, TIMP—2 и поликлональных антител — к десмину, MMP—1 (Thermo Scientific, LabVision).

Для оценки ИГХ окрашивания использовали пространственную медицинскую программу для анализа и обработки цифровых изображений ImageJ. По-

дробно методика моделирования ХП и полуколичественного анализа цифровых изображений опубликована нами ранее [10].

Достоверность различий показателей между группами и в динамике оценивали с помощью метода Вилкоксона — Манна — Уитни и Краскела — Уоллиса — для количественных признаков и точного критерия χ^2 Фишера — для частотных распределений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В контрольной группе наблюдали наибольшую частоту послеоперационных осложнений — 75%, летальность — 33,3%. В ткани ПЖ отмечены прогрессивные воспалительные и фиброзные изменения. При сравнении с состоянием до операции установлено достоверное уменьшение только одного показателя — виментина ($P < 0,05$), величина остальных показателей активности ЗК ПЖ имела тенденцию к уменьшению, без достоверных различий с таковой до операции.

При проведении медикаментозной терапии после операции отмечено достоверное уменьшение таких основных показателей активности ЗК ПЖ, как α -SMA, виментин, TIMP—2 по сравнению с таковыми в контрольной группе. В этих группах все животные живы.

При применении лизиноприла отмечена тенденция к уменьшению частоты послеоперационных осложнений до 44,4% после дистальной резекции ПЖ по сравнению с таковой в контрольной группе. По сравнению с контрольной группой достоверно снижалась экспрессия десмина ($P < 0,05$), GFAP ($P < 0,001$), отмечена тенденция к повышению активности MMP—1. Следовательно, при применении лизиноприла наблюдали только тенденцию к уменьшению фиброзного поражения ПЖ по сравнению с таковым в контрольной группе.

При применении ловастатина достоверно уменьшалась частота послеоперационных осложнений до 33,3% у крыс после дистальной резекции ПЖ по сравнению с таковой в контрольной группе. Под влиянием ловастатина наблюдали тенденцию к уменьшению GFAP ($P > 0,05$), содержание десмина не изменялось ($P > 0,05$) по сравнению с таковым в контрольной группе.

Отмечено достоверное замедление фиброзных изменений в ПЖ по сравнению с таковым в контрольной группе ($P < 0,05$).

Наиболее оптимальным оказалось сочетанное применение лизиноприла и ловастатина, что в полной мере соответствовало требованиям к проводимому лечению. Под влиянием комплексной терапии достоверно уменьшалась частота послеоперационных осложнений ($P < 0,05$) у крыс после дистальной резекции ПЖ по сравнению с таковой в контрольной груп-

пе, частота послеоперационных осложнений была наименьшей — 22,2%.

Отмечено значительное подавление всех маркеров, отражающих активное состояние ЗК ПЖ: уменьшение экспрессии α -SMA ($P < 0,001$), виментина ($P < 0,05$), десмина ($P < 0,001$), GFAP ($P < 0,05$) по сравнению с этими показателями в контрольной группе. Уменьшилась концентрация ингибитора MMP-2 ($P < 0,05$), при этом значительно повысился уровень MMP-1 ($P < 0,05$) по сравнению с таковым в контрольной группе. При сравнении с другими группами в этой группе наблюдали максимальное повышение уровня MMP-1, он достоверно отличался от такового во всех группах животных, которым проводили терапию после операции. Установлено достоверное замедление фиброзных изменений в ПЖ по сравнению с таковым в контрольной группе ($P < 0,05$), что свидетельствовало о наибольшей эффективности лечения после операции. При этом выраженность жировой дистрофии не отличалась от таковой в контрольной группе ($P > 0,05$).

Выводы

1. Дистальная резекция ПЖ у крыс с моделированным алкогольным ХП способствовала усугублению фиброзных изменений в ткани органа, вероятно, из-за влияния воспалительных цитокинов на активность ЗК ПЖ.

2. Под влиянием медикаментозной терапии после операции достоверно уменьшалась величина таких основных показателей активности ЗК ПЖ, как α -SMA, виментин, TIMP-2 по сравнению с таковыми в контрольной группе.

3. Проведенное экспериментальное исследование позволило установить преимущества комплексной терапии в подавлении активности ЗК ПЖ по сравнению с монотерапией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Effect of surgery for chronic pancreatitis on pancreatic function: Pancreaticojejunostomy and duodenum-preserving resection of the head of the pancreas / S. Maartense, M. Ledebuer, W. A. Bemelman [et al.] // *Surgery*. — 2004. — Vol. 135. — P. 125 — 130.
2. Long term follow-up of a randomized trial comparing the Beger and Frey procedures for patients suffering from chronic pancreatitis / T. Strate, Z. Taherpour, C. Bloechle [et al.] // *Ann. Surg.* — 2005. — Vol. 241. — P. 591 — 598.
3. RAS inhibitors decrease apoptosis of acinar cells and increase elimination of pancreatic stellate cells after in the course of experimental chronic pancreatitis induced by dibutyltin dichloride / A. Madro, A. Korolczuk, G. Czechowska [et al.] // *J. Physiol. Pharmacol.* — 2008. — Vol. 59, N 2. — P. 239 — 249.
4. Leung P. S. The physiology of a local renin-angiotensin system in the pancreas / P. S. Leung // *J. Physiol.* — 2007. — Vol. 580, N 1. — P. 31 — 37.
5. Angiotensin-converting enzyme inhibitor attenuates pancreatic inflammation and fibrosis in male Wistar Bonn/Kobori rats / A. Kuno, T. Yamada, K. Masuda [et al.] // *Gastroenterology*. — 2003. — Vol. 124, N 4. — P. 1010 — 1019.
6. Superoxide anion overproduction in sepsis: effects of vitamin E and simvastatin / R. Durant, K. Klouche, S. Delbosch [et al.] // *Shock*. — 2004. — Vol. 22. — P. 34 — 39.
7. Inhibition of pancreatic stellate cell activation by the hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor lovastatin / R. Jaster, P. Brock, G. Sparmann [et al.] // *Biochem. Pharmacol.* — 2003. — Vol. 65, N 8. — P. 1295 — 1303.
8. Talukdar R. Pancreatic stellate cells: new target in the treatment of chronic pancreatitis / R. Talukdar, R. K. Tandon // *J. Gastroenterol. Hepatol.* — 2008. — Vol. 23. — P. 34 — 41.
9. Development of an animal model of chronic alcohol-induced pancreatitis in the rat / K. Hiroshi, M. Nakagami, I. Rusyn [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* — 2001. — Vol. 280. — P. 1178 — 1186.
10. Ингибирование активированных звездчатых клеток лизиноприлом для предупреждения фиброза поджелудочной железы в модели хронического алкогольного панкреатита / М. Е. Ничитайло, Д. А. Кравченко, Е. Б. Медведский [и др.] // *Кліні. хірургія*. — 2012. — №7. — С. 52 — 56.

