



<sup>1</sup>Ю. Н. ОРЛОВСКИЙ, <sup>1</sup>Ю. М. ГАИН, <sup>1</sup>Т. Э. ВЛАДИМИРСКАЯ, <sup>1</sup>Т. М. ЮРАГА,  
<sup>2</sup>О. Н. ЧЕРНОВ

## ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ СТРИКТУР БИЛИОДИГЕСТИВНЫХ АНАСТОМОЗОВ ПРИ ИХ МОДЕЛИРОВАНИИ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

<sup>1</sup> Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

<sup>2</sup> Городская клиническая больница скорой медицинской помощи, Минск, Беларусь

**Цель исследования.** Создать экспериментальную модель стриктуры холедохоеюноанастомоза у лабораторных животных, максимально приближенную по своим характеристикам к клиническим условиям, оценив при этом роль биохимических маркеров, связанных с повреждением сосудов, воспалением и фиброзом, в крови и тканях зоны формирования патологического процесса, в развитии стриктур внепеченочных желчных протоков.

**Материал и методы.** Все животные были разделены на две группы: контрольную (группа 1) и основную (группа 2). Время наблюдения после моделирования патологии составило 15 и 30 сут. В группе 1 формировали стандартный холедохоеюноанастомоз на петле по Ру; в подгруппе 2а формировали холедохоеюноанастомоз на петле по Ру с импрегнацией зоны анастомоза нитратом калия для формирования стриктуры; в подгруппе 2б — холедохоеюноанастомоз на петле по Ру с механической травмой зоны анастомоза для формирования стриктуры. После выведения выполняли забор материала (участок зоны холедохоеюноанастомоза) для последующего морфологического и иммунологического исследований.

**Результаты.** В группе контроля (группа 1) на 15-е и 30-е сут. отмечалось адекватное заживление анастомоза с формированием в зоне соустья невыраженной рубцовой ткани (как элемент стандартных регенеративных процессов при формировании соустья). В подгруппах 2а и 2б на фоне воздействия на ткани соустья нитрата калия и механической травмы отмечено формирование некроза слизистой оболочки и глубжележащих тканей с образованием рубца, формирующегося как при ишемическом повреждении ткани с развитием грубой соединительной ткани и стриктуры анастомоза.

**Заключение.** В результате экспериментального моделирования стриктуры холедохоеюноанастомоза на лабораторных животных выявлена роль специфических биомаркеров в установлении причин избыточного рубцевания билиодигестивных соустьев. Предлагаемая модель позволяет изучить фазность течения патологического процесса и патогенеза развития стриктуры холедохоеюноанастомоза и наметить пути профилактики ее формирования в клинических условиях.

**Ключевые слова:** эксперимент, моделирование, стриктура, холедохоеюноанастомоз.

**Objective.** To create an experimental model of choledochojunostomy stricture in laboratory animals, which would be as close as possible in its characteristics to clinical conditions, while assessing the role of biochemical markers associated with vascular damage, inflammation and fibrosis in the blood and tissues of the pathological process formation zone, in the development of extrahepatic bile duct strictures.

**Materials and methods.** All animals were divided into two groups: control (group 1) and main (group 2). The observation time after pathology modeling was 15 and 30 days. Group 1 — a standard choledochojunostomy was formed on a Roux-en-Y loop; subgroup 2a — a choledochojunostomy was formed on a Roux-en-Y loop with impregnation of the anastomosis zone with potassium nitrate to form a stricture; subgroup 2b — a choledochojunostomy was formed on a Roux-en-Y loop with mechanical trauma to the anastomosis zone to form a stricture. After removal, material was collected (a section of the choledochojunostomy zone) for subsequent morphological and immunological studies.

**Results.** In the control group (group 1), adequate healing of the anastomosis was noted on days 15 and 30 with the formation of unexpressed scar tissue in the anastomosis zone (as an element of standard regenerative processes during anastomosis formation). In subgroups 2a and 2b against the background of the effect of potassium nitrate on the anastomosis tissue and mechanical trauma, necrosis of the mucosa and deeper tissues was noted with the formation of a scar, formed as in ischemic tissue damage with the development of coarse connective tissue and anastomotic stricture.

**Conclusion.** As a result of experimental modeling of choledochojunostomy stricture on laboratory animals, the role of specific biomarkers in establishing the causes of excessive scarring of biliodigestive anastomoses

*was revealed. The proposed model allows studying the phases of the pathological process and pathogenesis of the development of choledochojejunostomy stricture and outlining ways to prevent its formation in clinical conditions.*

**Key words:** *experiment, modeling, stricture, choledochojejunostomy.*

HEALTHCARE. 2024; 10: 69—77

#### **PATHOGENETIC FEATURES OF FORMATION OF STRICTURES OF BILIODIGESTIVE ANASTOMOSES DURING THEIR IN EXPERIMENTAL MODELING**

Y. N. Arlouski, Y. M. Gain, T. E. Vladimirskaia, T. M. Yuraga, O. N. Chernov

В настоящее время частота развития стриктур билиодигестивных анастомозов после реконструктивных вмешательств на желчевыводящих путях варьирует от 5 до 69 %. Среднее время до образования стриктуры после вмешательства колеблется от 11 до 30 мес. Это тяжелое осложнение, приводящее к развитию холангита, а в 9,2 % наблюдений — вторичного билиарного цирроза и портальной гипертензии, способствуя инвалидизации пациента [1].

Сегодня все чаще обсуждаются вопросы, ведутся поиски новых методов морфологического исследования с изучением молекулярных механизмов развития и ремоделирования стриктур желчных протоков. Известно, что повреждение тканей в зоне сформированного соустья желчных протоков с кишкой может быть вызвано различными агентами (инфекцией, токсинами, ишемией, механическими повреждениями), что влечет первичную воспалительную реакцию в зоне соединения и инициацию фиброза.

В развитии и поддержании воспалительной реакции участвует целый ряд клеточных элементов крови, а также тромбоциты, поврежденные эпителиальные и эндотелиальные клетки, которые выделяют химически активные вещества для привлечения моноцитов и нейтрофилов в зону повреждения тканей. Этот механизм имеет важное значение в процессе заживления любой раны, однако эти же клетки выделяют большое количество токсичных веществ, наносящих вред окружающим тканям. Так, активированные тромбоциты секретируют тромбоцитарный фактор роста (PDGF), являющийся мощным индукто-

ром клеток воспаления, и трансформирующий фактор роста (TGF- $\beta$ 1), стимулируя при этом синтез межклеточного вещества фибробластами и провоцируя развитие фиброза [2—4]. Ключевым компонентом этого процесса является TGF- $\beta$ 1, отличающийся выраженной провоспалительной и профибротической активностью. Макрофаги при этом выступают в роли одних из основных клеток, синтезирующих TGF- $\beta$ 1. Этот тромбоцитарный фактор роста, выступая в роли активного профибротического цитокина, непосредственно индуцирует дифференцировку фибробластов в направлении коллаген-секретирующих миофибробластов. Любое восстановление тканей после повреждения включает в себя сложный комплекс взаимодействий между клетками с участием химических сигналов и белков внеклеточного матрикса, создающих определенную микросреду. Параллельно с нейтрофилами макрофаги проникают в ишемизированную рану изначально в меньших количествах, но со временем (через 2—3 сут.) становятся в ней самыми распространенными клетками воспаления. Как и нейтрофилы, макрофаги незаменимы при удалении из раны некротизированных тканей и защите ее от инфекции, также они необходимы для регуляции процесса ремоделирования. Это во многом зависит от их способности вырабатывать и высвобождать цитокины (PDGF, TGF- $\beta$  и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF)), регулирующие функции фибробластов и ангиогенез [5; 6]. Этот «коктейль» растворимых факторов мощно стимулирует пролиферацию, миграцию и дифференцировку кератиноцитов, фибробластов

и эндотелиальных клеток, способствуя активации ангиогенеза и ремоделирования. Количество провоспалительных цитокинов, в том числе интерлейкина 6 (IL-6) и С-реактивного белка, коррелирует с выраженностью гипоксии [7; 8]. Продолжающаяся при фиброзе гипоксия постоянно увеличивает уровни TGF- $\beta$ 1 и, следовательно, производство межклеточного вещества, тем самым увеличивая фиброз [9].

К настоящему времени в доступных источниках литературы исследований по изучению патогенеза развития стриктур билиодигестивных анастомозов не установлено, что определяет высокую актуальность данной темы.

### Материал и методы

Эксперимент проведен на половозрелых кроликах (в возрасте 6—8 мес.) массой 3—4,5 кг, смешанных пород, содержащихся в стационарных условиях вивария на полноценном стандартном пищевом рационе и в соответствии с необходимыми требованиями на базе научно-исследовательской лаборатории НИИ экспериментальной и клинической медицины Белорусского государственного медицинского университета в стандартных условиях операционного блока. При выполнении всех манипуляций были соблюдены этические принципы, изложенные в постановлении Межпарламентской ассамблеи государств — участников Содружества Независимых Государств от 31.10.2007 № 29-17 «О модельном законе «Об обращении с животными» и в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1986).

Выполнение запланированных оперативных вмешательств под внутривенным наркозом у животных осуществляли с соблюдением всех правил биоэтики. Обезболивания достигали введением наркотических веществ (фентанил 0,005 % +

дроперидол 0,01 % в соотношении 2 : 1 на 100 г массы тела животного).

Все животные были разделены на две группы. Время наблюдения после моделирования патологии составило 15 и 30 сут. По истечении указанного времени животных выводили из эксперимента в соответствии со стандартами GLP путем введения максимальной дозировки тиопентала натрия 2 %. После выведения выполняли забор материала (участок зоны холедохоеюноанастомоза с участком печени) для последующего морфологического исследования.

В группе 1 (10 животных) под общим обезболиванием выполняли лапаротомию и визуальную ревизию внутренних органов. Выделяли общий желчный проток (ОЖП) на всем протяжении. Дистальную часть ОЖП резецировали. Формировали анастомоз между проксимальной частью ОЖП и петель тонкой кишки, выключенной по Ру однорядным узловым швом монофиламентной нитью 6/0—7/0. Далее формировали терминолатеральный энтероэнтероанастомоз по общепринятой методике в 10 см от связки Трейца однорядным непрерывным швом монофиламентной нитью 5/0—6/0. Брюшную стенку послойно ушивали непрерывным швом (рис. 1\*).

В группе 2 операцию выполняли по той же методике, что и в группе 1, но с обкалыванием зоны анастомоза (участок ОЖП и тощей кишки) нитратом калия (селитра) (подгруппа 2а — 15 животных) и наносили механическую травму пинцетом (подгруппа 2б — 15 животных). На 15-е и 30-е сут. после операции кроликов выводили из эксперимента и производили забор тканей зоны анастомоза и участка печени для гистологического и иммуногистохимического исследований, а также брали сыворотку крови для иммуноферментного анализа (ИФА).

**Морфологические исследования.** Для проведения гистологического исследования брали зону анастомоза, участка печени. Эти фрагменты фиксировали в нейтральном

\*Рис. 1—6 размещены на вклейке между с. 72 и 73.

формалине 10 %. Затем промывали в проточной воде в течение 24 ч, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации (70 %, 80 %, 96 %, абсолютный спирт). После этого полученный материал проводили по стандартному протоколу и заливали в парафин. Из готовых парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 3 мкм, которые окрашивали гематоксилином-эозином (обзорная окраска) и трихромом (выявление соединительной ткани). Изучение препаратов и изготовление микрофотографий выполняли с помощью светового микроскопа Motic (Китай).

**Иммуноферментный анализ.** В сыворотке крови экспериментальных животных (кролики) методом количественного твердофазного ИФА типа «сэндвич» определяли содержание уровней VEGF, IL-1 $\beta$ , PDGF, IL-6 с помощью коммерческих наборов реагентов фирмы FineTest (Китай). Измерение проводили с помощью фотометра универсального Ф300 («Витязь», Беларусь), количественное содержание перечисленных показателей в исследуемых образцах рассчитывали по калибровочной кривой, построенной по известным концентрациям в стандартах.

**Иммуногистохимические исследования.** Иммуногистохимические (ИГХ) исследования уровней экспрессии маркеров клеточной пролиферации проведены с использованием поликлональных антител PAI-1 (ингибитор активации плазминогена), VEGF, IL-1 $\beta$ , IL-6, Collagen 1 и 3, TGF- $\beta$ 1, Bcl-2 (регулятор апоптоза) проводили в соответствии с протоколами производителя. Количественную оценку экспрессии биомолекулярных маркеров выполняли путем анализа цифрового изображения, полученного с помощью микроскопа Leica DMLS с программным изображением (Leica, Германия) и цифровой камерой JVC с использованием алгоритма positive pixel count и программы для морфометрии Aperio Image Scope 12.3.3 (Leica, Германия).

**Статистический анализ.** Полученные данные обрабатывали с помощью статисти-

ческого метода исследования (пакет приложений Microsoft Office XP и программа Statistica 10.0). Проверку числовых значений на нормальность распределения осуществляли с помощью критерия Шапиро — Уилка. Различия между выборками оценивали используя U-тест Манна — Уитни и тест Краскелла — Уоллеса. При распределении, отличном от нормального, данные представляли в виде медианы (Me) и интервала между 25-м и 75-м процентиллями. Результаты считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

У всех животных примерно через 1 нед. появлялись признаки общей интоксикации: все кролики становились беспокойными, клинически отмечалось повышение температуры тела, развивалась тахикардия. Макроскопически в группе 2 при выведении животных из эксперимента в брюшной полости наблюдали умеренно выраженный спаечный процесс в верхнем этаже, расширение холедоха выше зоны анастомоза до 5—7 мм, напряжение желчного пузыря и проксимальных отделов желчевыводящих путей. При макроскопическом исследовании печени определяли отеочность ткани органа. После пересечения холедоха выше зоны анастомоза при заборе материала желчь изливалась под давлением, была темно-зеленой окраски, жидкой консистенции, мутная, иногда встречались мягкие желчные сгустки.

При проведении гистологического исследования тканей, взятых из краев зоны анастомоза, у животных группы 1 на 15-е сут. отмечена воспалительная инфильтрация стенки ОЖП, более выраженная со стороны слизистой оболочки, с образованием рыхлой отеочной соединительной ткани. Стенка холедоха была отеочной, в слизистой оболочке выявлены кровоизлияния, расширенные и полнокровные сосуды микроциркуляторного русла (рис. 2, а), вокруг швов визуализировался плотный рубец (рис. 2, б).



На 30-е сут. в зоне анастомоза отмечено формирование грубого соединительнотканного рубца (рис. 3, а). В области швов визуализировалась грануляционная и незрелая рубцовая ткань (рис. 3, б). Вокруг шовного материала выявлялись многочисленные клетки инородных тел и диффузно-очаговая лимфогистиоцитарная инфильтрация. Признаки эпителизации и участки нерезорбированного некроза отсутствовали.

В группе 2 на 15-е сут. в зоне анастомоза наблюдались распространенная выраженная лимфоцитарная инфильтрация всех слоев ОЖП, наложения фибрина по линии анастомоза. Определялся язвенно-некротический дефект слизистой оболочки, частично заполненный гнойно-некротическими массами. Со стороны тканей в области соустья наблюдалась выраженная сосудистая реакция: капилляры были резко расширены, переполнены кровью. В области швов отмечены некроз и воспаление тканей. Выявлено значительное утолщение стенки протока за счет разрастания грануляционной и фиброзной тканей (очагово замещающей мышечную и серозную оболочки) с очагами склероза (рис. 4, а) и грануляционной ткани разной степени зрелости (рис. 4, б).

В группе 2 на 30-е сут. в зоне анастомоза (в слизистой и мышечной оболочках) отмечалась выраженная лимфоцитарная инфильтрация. Вокруг шва располагалась рыхлая отечная соединительная ткань

(рис. 5, а). Наблюдались обилие клеток инородных тел, мелкие локусы некроза в слизистой оболочке, обширные поля грануляционной и фиброзной тканей разной степени зрелости (рис. 5, б). Коллагеновые волокна соединительной ткани располагались хаотично, клеточная структура была представлена преимущественно фибробластами. Стенка протока была утолщена за счет формирования плотного рубца (рис. 5, в).

Таким образом, результаты морфологического исследования показали, что в группе контроля (группа 1) на 15-е и 30-е сут. отмечалось адекватное заживление анастомоза с формированием в зоне соустья невыраженной рубцовой ткани (как элемент стандартных регенеративных процессов при формировании соустья). В группе 2 (подгруппы 2а и 2б) на фоне воздействия на ткани соустья нитрата калия и механической травмы отмечено формирование некроза слизистой оболочки и глубжележащих тканей с образованием рубца, формирующегося как при ишемическом повреждении ткани с развитием грубой соединительной ткани и стриктуры анастомоза и последующими изменениями в ткани печени — возникновением холангита и холестатического синдрома.

Результаты ИГХ исследования экспрессии основных биомаркеров воспаления и начала фибротических процессов в зоне анастомоза представлены в табл. 1.

Таблица 1

Иммуногистохимическая оценка экспрессии биомаркеров в зоне анастомоза кроликов

Срок выве- дения	Показатели								p
	VEGF (40,93)*	PAI 1 (39,48)	IL-1β (53,69)	IL-6 (31,86)	Coll.1 (46.62)	Coll.3 (27,23)	TGF-β (21,42)	Bcl-2 (36,24)	
Группа 1 (ИЭ %)									
15-е сут.	78,64	43,85	78,30	41,69	44,14	37,42	46,04	30,95	< 0,05
30-е сут.	50,67	52,31	38,44	34,52	43,07	37,45	26,38	44,90	< 0,05
Подгруппа 2а (ИЭ %)									
15-е сут.	51,42	39,25	46,79	42,65	67,80	35,46	43,23	44,37	<0,05
30-е сут.	37,83	47,54	32,81	50,52	41,41	26,51	51,11	58,47	< 0,05
Подгруппа 2б (ИЭ %)									
15-е сут.	38,82	26,84	23,14	32,04	68,77	26,29	63,01	13,48	< 0,05
30-е сут.	44,67	24,02	35,77	23,71	48,62	57,05	24,57	47,75	< 0,05

\* — контрольные значения.

Воспаление всегда сопряжено с процессами ангиогенеза. К наиболее хорошо изученным регуляторам ангиогенеза относится VEGF. При количественном анализе экспрессии VEGF были установлены достоверные различия ( $p < 0,05$ ) экспрессии биомаркера между всеми группами и группой контроля через 15 сут. эксперимента. Максимальный уровень экспрессии эндотелиального фактора роста наблюдали в группе 1 через 15 сут. эксперимента. Через 30 сут. наблюдения экспрессия VEGF в группе 2 достоверно не отличалась от контрольных значений, что может свидетельствовать об интенсификации процесса склерозирования.

На раннем сроке эксперимента не было выявлено статистически значимых различий уровней экспрессии PAI-1 в экспериментальной и контрольной группах. В динамике экспрессия PAI-1 повышалась. Высвобождение провоспалительных цитокинов в сочетании с повышенным уровнем тромбина также провоцирует и усиливает синтез PAI-1, являющегося белком острой фазы воспаления. PAI-1 оказывает антифиброзный эффект, который связан с повышенной активностью матриксных металлопротеиназ, повышенной проницаемостью сосудов, ингибированием плазминогена и изменением содержания TGF- $\beta$ , который способствует фиброгенезу. Снижение экспрессии PAI-1 является прогностическим признаком фиброза. Количественный анализ экспрессии PAI-1 показал достоверные различия ( $p < 0,05$ ) экспрессии биомаркера в зоне анастомоза кроликов между подгруппами 2a и 2b и группой контроля через 30 сут. опыта.

Уровень экспрессии IL-1 $\beta$  был статистически значимо выше ( $p < 0,05$ ) у кроликов группы 1 через 15 сут. эксперимента по сравнению с животными группы 2. В динамике наблюдения уровень экспрессии провоспалительного фактора у кроликов группы 1 снижался ( $p < 0,05$ ). У кроликов группы 2 не наблюдали статистически значимых различий в уровне IL-1 $\beta$  как по

сравнению с группой контроля, так и в динамичном наблюдении.

При количественной оценке экспрессии IL-6 в зоне анастомоза выявили достоверное повышение ( $p < 0,05$ ) исследуемого фактора в экспериментальных подгруппах по сравнению с группой контроля на всех сроках наблюдения. Через 30 сут. эксперимента уровень IL-6 был значительно выше ( $p < 0,05$ ) в группе 2, чем в группе 1. Статистически значимых различий ( $p > 0,05$ ) по уровню экспрессии биомаркера в динамическом наблюдении отмечено не было.

Таким образом, количественный анализ экспрессии IL-6 показал статистически значимое повышение экспрессии этого цитокина по сравнению с контрольными значениями, при этом уровень его экспрессии оставался стабильно высоким и в динамике эксперимента. В то же время количественный анализ экспрессии IL-1 $\beta$  выявил резкое повышение уровня провоспалительного цитокина в группе 1 и в основном на ранних сроках эксперимента. Так как IL-6 является одним из основных медиаторов воспаления с широким спектром действия, повышение его экспрессии свидетельствует о выраженной воспалительной реакции, при этом повышение IL-1 $\beta$  на ранних сроках эксперимента может свидетельствовать об острейшей фазе воспаления.

По мере развития воспалительного процесса в ткани холедохоеюноанастомоза наблюдалось ремоделирование экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ) стенки холедоха, заключающееся в изменении содержания коллагена I и III типа и TGF. Соотношение коллагена I типа и коллагена III типа у кроликов группы 2 было максимальным за счет значительного повышения синтеза коллагена I типа и уменьшения синтеза коллагена II типа, что свидетельствует об усилении жесткости ЭЦМ и усилении процесса склерозирования. У кроликов подгруппы 2b через 30 сут. наблюдения синтез высокопрочного коллагена I типа был снижен, однако наблюдалось

увеличение синтеза коллагена III типа; через 15 сут., где у животных происходила перестройка активности коллагенообразования в сторону увеличения синтеза основной матрицы ремоделирования — коллагена III типа и снижения коллагена I типа. При этом фибротические процессы преобладали на 15-е сут. опыта, механизмы компенсации процесса ремоделирования активно включались на 30-е сут. Аналогичная динамика экспрессии тканевого фактора TGF в зоне анастомоза у кроликов подгруппы 2b также свидетельствовала о включении компенсаторных механизмов, тогда как у животных подгруппы 2a динамика экспрессии TGF показывала стабильное его повышение, что свидетельствовало о развитии склеротических/рубцовых процессов.

Экспрессия антиапоптотического белка Bcl-2 по сравнению с группой контроля была значимо ниже ( $p < 0,05$ ) у животных подгруппы 2b и выше у животных подгруппы группы 2a на 15-е сут. эксперимента. К 30-м сут. экспрессия Bcl-2 у кроликов этих групп повышалась и была значительно выше ( $p < 0,05$ ) контрольных значений. Высокая экспрессия антиапоптотического белка Bcl-2 в определенной мере ограничивает апоптоз, способствуя активной пролиферации клеток, в том числе синтезирующих основные компоненты ЭЦМ. Ингибирование апоптоза в зоне анастомоза наблюдалось в большей степени у животных группы 2, оно ассоциируется с высокой экспрессией тканевого фактора фибро-

за и коллагена I типа. Результаты ИФА представлены в табл. 2.

Сниженные показатели VEGF в группе 2 в сыворотке крови кроликов свидетельствуют о выраженной тканевой пролиферации в зоне анастомоза и начале репаративных процессов. Повышенные значения IL-1 $\beta$  и IL-6 свидетельствуют о выраженном воспалении в зоне соустья, особенно на 30-е сут. на фоне повреждения тканей при инъекции нитрата калия и запуске репаративных процессов с формированием грубоволокнистой соединительной ткани.

Данные гистопатологии стриктуры холедохоеюноанастомоза у лабораторных животных выявили информативные иммуногистохимические критерии острой и острейшей фаз воспаления и склероза. Выявленные прямые зависимости между экспрессией вышеуказанных биомаркеров в ткани холедохоеюноанастомоза у кроликов и концентрацией этих биомаркеров в сыворотке крови дают возможность использовать лабораторные показатели крови для оценки гистопатологических изменений.

Гиперэкспрессия VEGF в ткани холедохоеюноанастомоза, с одной стороны, может свидетельствовать о начале неоангиогенеза, а с другой — о вовлечении VEGF в процесс активации миграции воспалительных клеток. Выявленные прямая умеренная (группа 1) и сильная (группа 2) корреляции экспрессии в ткани VEGF в сыворотке крови позволит использовать этот биохимический маркер для оценки фазы воспалительного процесса.

Таблица 2

Динамика биомаркеров в сыворотке крови кроликов

Сроки выведения	Показатели				p
	VEGF (1096,00) *	PDGF (18,35)	IL-1β (125,50)	IL-6 (446,00)	
Группа 1 (ИЭ %)					
15-е сут.	858,00	21,00	112,00	438,00	< 0,05
30-е сут.	810,00	28,10	131,00	451,00	< 0,05
Группа 2 (ИЭ %)					
15 сутки	858,00	20,50	143,00	496,00	< 0,05
30-е сут.	810,00	17,25	235,50	1025,50	< 0,05

\* — контрольные значения.

IL-6 является одним из основных медиаторов воспаления с широким спектром действия, повышение его экспрессии свидетельствует о выраженной воспалительной реакции. Максимальное повышение экспрессии IL-6 отмечается у кроликов группы 2, гистологическое исследование показывает наличие выраженной воспалительной инфильтрации ткани холедоха. Так как отмечается сильная корреляционная связь между ИФА и ИГХ исследованием для IL-6 у кроликов группы 2, повышение этого показателя в сыворотке крови экспериментальных животных (подгруппы 2a и 2b) свидетельствует об остром воспалительном процессе у кроликов в зоне холедохоеюноанастомоза.

В отличие от животных группы 1 и подгруппы 2a у кроликов подгруппы 2b отмечалась сильная связь между ИФА и ИГХ исследованием для IL-1 $\beta$  ( $r = 0,842$ ). Так как провоспалительный цитокин IL-1 $\beta$  связан с противовоспалительным цитокином IL-10, соотношение которых формирует фенотип иммунного ответа, можно предположить, что изменение содержания в крови IL-1 $\beta$  свидетельствует о включении компенсаторных механизмов про- или противовоспалительного фенотипа в зависимости от преобладания воспаления или фиброза. Таким образом, повышение уровня IL-6 указывает на воспалительный процесс при развитии стриктуры холедохоеюноанастомоза, повышение уровня IL-1 $\beta$  — о включении провоспалительных механизмов при прогрессировании фиброза.

На всех сроках эксперимента экспрессия PDGF была повышенной по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ), максимум экспрессии PDGF отмечен через 30 сут. у животных группы 2. Поскольку PDGF также является важным фактором хемотаксиса, пролиферации и активации матрикс-образующих клеток (в том числе миофибробластов), можно предположить, что повышенная экспрессия биомаркера связана с процессами

фиброза. Выявленная статистически значимая сильная корреляционная взаимосвязь между ИФА и ИГХ PDGF открывает перспективы для использования этого биомаркера в диагностике и прогнозировании развития фиброза.

По результатам анализа установлены прямые корреляционные связи умеренной силы между содержанием в ткани и крови IL-6, эндотелиального и тромбоцитарного факторов роста у кроликов группы 1, тогда как для IL-1 $\beta$  корреляционная связь оставалась слабой. Для кроликов группы 2 прямые сильные корреляционные связи были отмечены между ИФА и ИГХ исследованием для VEGF, PDGF и IL-6 (рис. 6). У кроликов подгруппы 2b были отмечены прямые сильные корреляционные связи между ИГХ исследованием и ИФА для IL-1 $\beta$  и PDGF.

## Выводы

1. Разработанная и апробированная новая экспериментальная модель стриктуры холедохоеюноанастомоза у кроликов, подтверждаемая морфологическим исследованием и корреляционным анализом биомаркеров в тканях и сыворотке крови, показала, что регенерация в зоне анастомоза у животных группы 1 завершается адекватным рубцеванием, у животных группы 2 отмечаются удлинение сроков регенерации, сохранение воспалительного инфильтрата тканей в зоне соустья на 30-е сут. с отсутствием эпителизации, избыточным разрастанием грубоволокнистой соединительной ткани и появлением очагов склероза (формирование рубцовых стриктур).

2. При прогрессировании фиброза в зоне холедохоеюноанастомоза увеличивается экспрессия антиапоптотического фактора Bcl-2, что является неблагоприятным фактором, ведущим к развитию стриктуры.

По мере развития воспалительного процесса в ткани холедохоеюноанастомоза наблюдается ремоделирование экстрацеллюлярного матрикса, заключающееся



в изменении содержания коллагена I и III типа и TGF ( $p < 0,05$ ). Прогностическими лабораторными маркерами развития стриктуры желчных протоков может являться повышение концентрации в сыворотке крови PDGF, VEGF, IL-6.

#### Контактная информация:

Орловский Юрий Николаевич — к. м. н., доцент кафедры хирургических болезней.

Белорусский государственный медицинский университет.

Ул. Кижеватова, 58, 220024, г. Минск.

Сл. тел. +375 29 637-46-68.

#### Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования: Ю. Н. О., Ю. М. Г., Т. Э. В., Т. М. Ю., О. Н. Ч.

Сбор информации и обработка материала: Ю. Н. О., Ю. М. Г., Т. Э. В., Т. М. Ю., О. Н. Ч.

Написание текста: Ю. Н. О., Ю. М. Г.

Редактирование: Ю. Н. О., Ю. М. Г.

Конфликт интересов отсутствует.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Long-term impact of iatrogenic bile duct injury / A. M. Schreuder [et al]. — *Dig Surg.* — 2020. — Vol. 37. — № 1. — P. 10—21.
2. Chambers, R. C. Procoagulant signalling mechanisms in lung inflammation and fibrosis: novel opportunities for pharmacological intervention? / R. C. Chambers // *British J. of Pharmacol.* — 2008. — Vol. 153, № S1. — P. S367—S378.
3. Growth factors and cytokines in wound healing / S. Barrientos [et al] // *Wound Repair and Regeneration.* — 2008. — Vol. 16, № 5. — P. 585—601.
4. In liver fibrosis, dendritic cells govern hepatic inflammation in mice via TNF- $\alpha$  / M. K. Connolly [et al.] // *The J. of Clin. Investigation.* — 2009. — Vol. 119, № 11. — P. 3213—3225.
5. Mirza, R. Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice / R. Mirza, L. A. Dipietro, T. J. Koh // *The Am. J. of Patholgy.* — 2009. — Vol. 175, № 6. — P. 2454—2462.
6. Inadequate blood supply persists in keloids. Scand / K. Ueda [et al] // *J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.* — 2004. — Vol. 38. — P. 267—271.
7. Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation / B. Krüger [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* — 2009. — Vol. 106, № 9. — P. 3390—3395.
8. Toll-like receptor and cytokine gene expression in the early phase of human lung transplantation / C. F. Andrade [et al] // *The J. of Heart and Lung Transplant.* — 2006. — Vol. 25, № 11. — P. 1317—1323.
9. Uncontrolled expression of vascular endothelial growth factor and its receptors leads to insufficient skin angiogenesis in patients with systemic sclerosis / O. Distler [et al.] // *Circulation Research.* — 2004. — Vol. 95, № 1. — P. 109—116.

Поступила 20.08.2024

Принята к печати 03.09.2024