

## OPEN ACCESS

DOI: 10.25040/ntsh2024.02.13

**Адреса для листування:** Кафедра хірургії-2 Навчально-наукового інституту післядипломної освіти, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, пр. Маяковського, 26, Запоріжжя, Україна, 69035

**Е-пошта:** mikheev.u.a@gmail.com

**Надійшла до редакції:** 12.11.2024

**Взята до друку:** 15.12.2024

**Опублікована:** 27.12.2024

### ORCID IDs

Юрій Міхеев:

<https://orcid.org/0000-0002-0305-1570>

Василь Скрипко:

<https://orcid.org/0000-0002-1555-2030>

Андрій Пасько:

<https://orcid.org/0000-0002-6688-7666>

Оксана Попадинець:

<https://orcid.org/0000-0002-2093-5984>

### Особистий внесок авторів:

**Концепція:** Юрій Міхеев;

**Збирання й аналіз даних:** Василь Скрипко, Андрій Пасько;

**Написання:** Юрій Міхеев, Василь Скрипко, Андрій Пасько;

**Редагування та затвердження остаточного варіанту:** Юрій Міхеев, Оксана Попадинець.

**Конфлікт інтересів:** автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

### Дозвіл комісії з питань біоетики:

Схвалено на засіданні Вченої ради ДЗ «ЗМАПО МОЗ України» (протокол схвалення № 8 від 27.12.2016). Усі пацієнти дали письмову інформовану згоду на участь у цьому дослідженні. Під час виконання дослідження було дотримано біоетичних норм вітчизняного та міжнародного законодавства, зокрема положень Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації.

**Фінансування:** Робота виконана відповідно до плану наукових робіт кафедри хірургії та малоінвазивних технологій ЗМАПО МОЗ України «Удосконалення сучасних методів діагностики та лікування запальних та пухлинних захворювань гепатопанкреатобілярної системи» (номер держреєстрації 0118U003969).



© Всі автори, 2024

## Патоморфологічні особливості підшлункової залози залежно від терміну захворювання на хронічний панкреатит

Юрій Міхеев<sup>1</sup>, Василь Скрипко<sup>2</sup>, Андрій Пасько<sup>2</sup>, Оксана Попадинець<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Запоріжжя, Україна

<sup>2</sup> Івано-Франківський національний медичний університет, Івано-Франківськ, Україна

**Вступ.** Клінічні прояви хронічного панкреатиту (ХП) виникають унаслідок запального процесу з розвитком складних морфологічних змін, що проявляються заміщенням паренхіми підшлункової залози (ПЗ) сполучною тканиною та розвитком різноманітних ускладнень. Вибір оптимальної патогенетичної хірургічної тактики лікування є актуальним питанням сьогодення.

**Мета дослідження:** виконати оцінку морфологічного та імуногістохімічного стану паренхіми ПЗ залежно від терміну захворювання на ХП.

**Методи.** Ретроспективно обстежені 147 (57.1 %) пацієнтів. У проспективному порівняльному дослідженні, до якого було залучено 257 пацієнтів, проаналізовані найближчі та віддалені результати з оцінкою ефективності розробленої в клініці тактики «рання хірургія» і способів хірургічного лікування ХП. Виконано оцінку морфологічного та імуногістохімічного стану паренхіми ПЗ. Виконано також аналіз віддалених результатів основних способів патогенетичного хірургічного лікування ХП.

**Результати.** Виявлені зміни морфо-функціонального стану паренхіми ПЗ у терміни більше 3 років (медіана 5.85 р.) від початку клінічного прояву ХП, які характеризуються прогресуванням фіброзу через зростання рівня експресії колагену I типу та фібронектину, що обумовлює щільний муфтоподібний периневральний та периваскулярний фіброз

і стенозування просвіту протоків ПЗ навколо «тубулоподібних» комплексів, і клінічно відповідає наявності інтенсивного больового синдрому.

**Висновки.** Встановлено важливу роль панкреатичних зірчастих клітин у розвитку фіброзу паренхіми ПЗ при хронічному панкреатиті. Фіброзне ураження ПЗ є незворотним, а морфологічні і структурні зміни призводять до її екзо- та ендокринних функціональних порушень. Виявлено, що експресія колагену I типу простежувалася в ацинарній тканині з тонкими прожилками в острівцях Лангерганса у терміни більше 3 років від початку клінічного прояву ХП. Встановлена інтраепітеліальна протокова неоплазія, яка згодом може призвести до розвитку протокової аденокарциноми ПЗ. Доведено, що покращення результатів хірургічного лікування ускладнених форм ХП з білярною та протоковою гіпертензією досягається при плановому

## Pathomorphological features of the pancreas depending on chronic pancreatitis duration

Iurii Mikheiev<sup>1</sup>, Vasyl Skrypko<sup>2</sup>, Andrii Pasko<sup>2</sup>,  
Oksana Popadynets<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University,  
Zaporizhzhia, Ukraine

<sup>2</sup>Ivano-Frankivsk National Medical University,  
Ivano-Frankivsk, Ukraine

**Introduction:** Chronic pancreatitis (CP) presents clinically as an inflammatory process that leads to complex morphological changes, resulting in the replacement of pancreatic parenchyma with connective tissue and the development of various complications. Defining an optimal surgical strategy remains a relevant issue today.

The purpose of the study was to assess the morphological and immunohistochemical characteristics of the pancreatic parenchyma depending on CP duration.

**Methods:** A total of 147 (57.1%) patients were examined retrospectively. A prospective comparative study involving 257 patients analyzed the short and long-term outcomes to evaluate the effectiveness of the "early surgery" strategy developed at the clinic and the surgical management methods for CP. The study conducted a morphological and immunohistochemical assessment of the pancreatic parenchyma, analyzing the long-term outcomes of the primary pathogenetic surgical treatments for CP.

**Results:** Morpho-functional changes in the pancreatic parenchyma, observed more than three years (median 5.85 years) after the onset of CP clinical manifestations, were characterized by progressive fibrosis due to increased expression of type I collagen and fibronectin, which resulted in dense cuff-like perineural and perivascular fibrosis and stenosis of the pancreatic ducts around tubular complexes, clinically corresponding to the presence of intense pain syndrome.

**Conclusions:** An essential role of pancreatic stellate cells in developing pancreatic parenchymal fibrosis in CP has been established. Fibrotic lesions of the pancreas are irreversible, and the resulting morphological and structural changes lead to both exocrine and endocrine dysfunction. More than three years after the onset of clinical manifestations of CP, type I collagen expression was observed in the acinar tissue, with thin strands detected within the islets of Langerhans. Intraepithelial ductal neoplasia was also identified, which may later progress to ductal adenocarcinoma of the pancreas. It has been demonstrated that the improvement in surgical outcomes for complicated forms of CP with biliary and ductal hypertension is achieved through planned surgery within the first three years of CP development, before the onset of irreversible pathological changes, including the potential for oncological transformation of the pancreas.

**Keywords:** pancreas, chronic pancreatitis, morphological changes, fibrosis.

OPEN ACCESS

DOI: 10.25040/ntsh2024.02.13

**For correspondence:** Department of Surgery 2, Educational and Scientific Institute of Postgraduate Education, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, 26 Maiakovskiy Ave., Zaporizhzhia, 69035

**E-mail:** mikheev.u.a@gmail.com

**Received:** 12 Nov, 2024

**Accepted:** 15 Dec, 2024

**Published:** 27 Dec, 2024

**ORCID IDs**

Iurii Mikheiev:

<https://orcid.org/0000-0002-0305-1570>

Vasyl Skrypko:

<https://orcid.org/0000-0002-1555-2030>

Andrii Pasko:

<https://orcid.org/0000-0002-6688-7666>

Oksana Popadynets:

<https://orcid.org/0000-0002-2093-5984>

**Disclosures:** The authors declared no conflict of interest.

**Author Contributions:**

*Conceptualization:* Iurii Mikheiev;

*Results of study:* Vasyl Skrypko, Andrii Pasko;

*Writing:* Iurii Mikheiev, Vasyl Skrypko,

Andrii Pasko;

*Review & editing:* Iurii Mikheiev, Oksana Popadynets.

**Ethical approval:** Approved at the meeting of the Academic Council of the Zaporizhzhia Medical Academy of Postgraduate Education, Ministry of Health of Ukraine (Protocol No. 8, dated December 27, 2016). All patients provided informed consent to participate in this study. During the research, bioethical standards of both national and international legislation were adhered to, including the provisions of the WMA Declaration of Helsinki.

**Funding:** The work is carried out according to the research plan of the Department of Surgery and Minimally Invasive Technologies of the Zaporizhzhia Medical Academy of Postgraduate Education, Ministry of Health of Ukraine "Improvement of Modern Methods of Diagnosis and Treatment of Inflammatory and Chronic Diseases of the Hepatopancreatobiliary System" (State Registration Number 0118U003969).



© All authors, 2024

оперативному лікуванні у терміни розвитку ХП до 3 років, тобто, до виникнення незворотних патологічних процесів, включно із вірогідністю онкологічної трансформації ПЗ.

**Ключові слова:** підшлункова залоза, хронічний панкреатит, морфологічні зміни, фіброз.

### Вступ

Біль є найпоширенішим симптомом хронічного панкреатиту (ХП), який спостерігається у 50 – 85 % пацієнтів [1]. Механізм виникнення болю при ХП багатофакторний і недостатньо вивчений. Було запропоновано кілька гіпотез для пояснення болю при ХП, включно з панкреатичною гіпертензією або підвищенням тиску в паренхімі підшлункової залози, утворенням кіст, гіпертрофією інтрапанкреатичних нервових волокон, нейропатичними змінами та пошкодженням тканин унаслідок оксидантного стресу [2]. Вважається, що біль при ХП є наслідком патогенної взаємодії між паренхімою підшлункової залози, імунними клітинами та периферичною нервовою системою [3].

Комплексний патогенез болю при ХП є серйозною клінічною проблемою в сучасній панкреатології, і розуміння його механізмів має важливе значення для вибору ефективного лікування цієї популяції пацієнтів [4].

Патологічною особливістю ХП і протокової аденокарциноми є прогресивний фіброз, опосередкований панкреатичними зірчастими клітинами (ПЗК). Один із найбільш ранніх клітинних механізмів фіброзу – активація ПЗК через ауто- і паракринні механізми, що вказує на те, що ефекти активації ПЗК – первинне запалення і фіброз як результат, можуть прогресувати навіть після усунення первинного шкідливого фактора.

ПЗК відіграють важливу роль у розвитку фіброзу при ХП. Зірчасті клітини активуються безпосередньо через токсичні чинники, такі як алкоголь або хемокіни, трансформаційний фактор росту бета (TGF-beta), тромбоцитарний фактор росту, які виділяються при некротичному запаленні ПЗ, що згодом призводить до утворення колагену та інших білків позаклітинного матриксу в інтерстиціальному просторі, пошкодження і деформації ацинарних і протокових панкреатичних клітин [5]. Зрештою це призводить до втрати часточкової структури ПЗ і деформації

ції великих панкреатичних протоків, складних змін острівкового апарату [6]. Фіброзне ураження ПЗ є незворотним, а морфологічні та структурні зміни призводять до екзо- та ендокринних функціональних порушень і, зрештою, до виснаження і цукрового діабету. ПЗ зазвичай змінена дифузно (хоча можлива деяка мозаїчність стосовно тяжкості змін). Кардинальна морфологічна тріада при ХП: фіброз, втрата ацинарної тканини (атрофія) і протокові зміни (звуження і дилатація) [7]. Макроскопічно ПЗ щільна і зморщена, з нерівними контурами, головна панкреатична протока (ГПП) та малі протоки розширені, в протоках можуть бути конкременти. Нормальна макроскопічна дольчатість паренхіми ПЗ може бути різко змінена або втрачена внаслідок фіброзного рубцювання.

На мікроскопічному рівні дольковий розподіл протоків збережено, очевидний міждольковий і внутрішньодольковий фіброз, що супроводжується втратою ацинарних клітин. Протоки звивисті і розширені, часто містять протеїнові пробки (пластинчасті еозинофільні маси) і конкременти, навколо протоків може простежуватися перидуктальний фіброз з деструкцією епітелію протоків. Також можлива дуктулярна проліферація в часточках. Зміни в протоках можуть бути як причиною, так і наслідком фіброзу. Фіброз унаслідок повторних епізодів запалення, некрозу і репаративних змін призводить до утворення стриктур і обструкції протоків [8]. Інші ознаки ХП містять конгломерати острівцевих клітин.

Натепер відтворюваних і загальноприйнятих гістологічних класифікацій тяжкості ХП немає. Часто використовують градації «легкий», «помірний» і «важкий», але часом їх важко розрізнити. У більшості досліджень науковці використовують шкалу фіброзу, запроповану в 1991 році [9], комбіновану з оцінкою панкреатичної функції [10].

Щодо сучасних тенденцій у хірургічному лікуванні ДЦП, кращий контроль полег-

## Introduction

Pain is the most common symptom of chronic pancreatitis (CP), affecting between 50% and 85% of patients [1]. The mechanism of pain in CP is multifactorial and poorly understood. Several hypotheses have been proposed to explain pain in CP, including pancreatic ductal hypertension or increased pressure in the pancreatic parenchyma, cyst formation, hypertrophy of intrapancreatic nerve fibers, neuropathic changes, and tissue damage due to oxidative stress [2]. Pain in CP is thought to result from a pathogenic interplay among the pancreatic parenchyma, immune cells, and the peripheral nervous system [3].

The complex pathogenesis of pain in CP presents a significant clinical challenge in modern pancreatology, and an understanding of its mechanisms is essential for selecting effective treatments for this patient population [4].

A pathological characteristic of CP and ductal adenocarcinoma is the progressive fibrosis mediated by pancreatic stellate cells (PSCs). One of the earliest cellular mechanisms of fibrosis involves the activation of PSCs through autocrine and paracrine signaling, suggesting that the effects of PSC activation, including the initial inflammation and subsequent fibrosis, can progress even after removing the primary damaging factor.

PSCs play a crucial role in the development of fibrosis in CP. They are directly activated by toxic factors such as alcohol or chemokines, transforming growth factor beta (TGF-beta), and platelet-derived growth factor (PDGF), which are released during necrotic inflammation of the pancreas, leading to the deposition of collagen and other extracellular matrix proteins in the interstitial space and resulting in damage to and deformation of pancreatic acinar and ductal cells [5]. Ultimately, this leads to the loss of the pancreatic lobular architecture, deformation of the main pancreatic ducts, and significant changes in the islet apparatus [6]. Fibrotic damage to the pancreas is irreversible, and the resulting morphological and structural changes lead to both exocrine and endocrine dysfunction, ultimately resulting in pancreatic insufficiency and the onset of diabetes mellitus. The pancreas is typically affected diffusely, although variations in the severity

of changes may present as a mosaic pattern. The cardinal morphological features in CP are the triad of fibrosis, loss of acinar tissue (atrophy), and duct changes (narrowing and dilation) [7]. Macroscopically, the pancreas is firm and shrunken with irregular contours; the main pancreatic duct (MPD) and smaller ducts are dilated, with the potential presence of calculi within the ducts. The normal macroscopic lobulation of the parenchyma may be markedly altered or lost due to fibrotic scarring.

On microscopy, the lobular arrangement of ducts remains intact, but interlobular and intralobular fibrosis is evident, accompanied by the loss of acinar cells. The ducts are tortuous and dilated, often containing protein plugs (lamellar eosinophilic masses) and calculi; periductal fibrosis, accompanied by destruction of the duct epithelium, is frequently observed surrounding the ducts. Ductular proliferation may also be observed within the lobules. Changes in the ducts may lead to fibrosis and/or result from fibrosis. In response to recurrent episodes of inflammation, necrosis, and reparative changes, fibrosis results in strictures and ductal obstruction [8]. Other signs of CP include the presence of islet cell conglomerates.

Currently, there is no reproducible and universally accepted histological grading system for the severity of CP. The terms "mild," "moderate," and "severe" are commonly used, but they can be challenging to differentiate in practice. Most research studies use the fibrosis scoring system proposed in 1991 [9], combined with an assessment of pancreatic function [10].

Regarding current trends in the surgical treatment of CP, better relief control and preservation of exocrine pancreatic function are observed with early surgery. The generally accepted definition of early surgery is three or fewer years from the onset of the disease [11]

The purpose of the study was to assess the morphological and immunohistochemical characteristics of the pancreatic parenchyma depending on CP duration.

## Patients and Methods

Morpho-histochemical changes in the pancreas in CP were analyzed using pancreatic tis-

шення та збереження екзокринної функції підшлункової залози простежується при ранньому хірургічному втручанні. Загальноприйняте визначення раннього хірургічного втручання – три або менше років від початку захворювання [11].

**Мета дослідження:** виконати оцінку морфологічного та імуногістохімічного стану паренхіми підшлункової залози залежно від терміну захворювання на хронічний панкреатит.

### Матеріал та методи досліджень

Вивчення морфогістохімічних змін ПЗ при ХП проводили на біопсійному матеріалі тканини ПЗ під час хірургічного втручання (гістологічний матеріал брали у більшості випадків з головки підшлункової залози). Матеріал (шматочки) забирали та обробляли згідно із загальновизначеними методами. Виконували фіксацію у 10 % нейтральному розчині формаліну з фарбуванням зрізів гематоксиліном та еозином і ущільненням парафіном. На прецизійному ротаційному мікромомі Microm HM-340E (Thermo Scientific, США) виготовляли зрізи товщиною 4 мкм, які поміщали на адгезивні предметні скельця (SuperFrsot Plus, Menzel Gläser, Німеччина) для імуногістохімічного (ІГХ) дослідження. ІГХ дослідження виконували за стандартною методикою з використанням моноклональних мишачих антитіл Smtoh Muscle Actin (Clnoe 1A4) проти  $\alpha$ -ізоформи гладком'язового актину ( $\alpha$ -SMA) та Desmin (Clnoe D33) проти десміну (DAKO, США), моноклональних кролячих антитіл I (Clnoe RAH C11) проти колагену I-го типу (Імтек, РФ) та поліклональних кролячих антитіл Fibronectin проти фібронектину (DAKO, США). Для цього після депарафінації, високотемпературного демаскування антигенів у Трис-ЕДТА буфері з рН=9 і блокування активності ендогенної пероксидази у тривідсотковому розчині перекису водню виконували інкубацію з первинними антитілами згідно з рекомендаціями фірми-виробника, і візуалізацію ІГХ реакції діамінобензидіном (DAKO, США). Оцінювання результатів ІГХ реакції виконували з використанням мікроскопа AxioPlan 2 (Carl Zeiss, Німеччина) та цифрової фотокамери C5060WZ (Olympus, Японія). Для фотоморфометричного дослідження в кожному випадку фотографували 10 полів зору. Для уніфікації

отриманих даних фотографування виконували у стандартизованих умовах: збільшення мікроскопа  $\times 200$ , колір (температура) освітлення 3200 К, параметри фотокамери F3.2 (діафрагма), 1/400 (витримка), ISO 100 (світлочутливість), ручний баланс білого торкання. Кількісне визначення рівнів інтенсивності та відносної площі експресії досліджуваних стромальних маркерів виконували з використанням медичної програми для обробки цифрових зображень ImageJ v.1.48 та з використанням вбудованого плагіна Couolr Deconvloutino і схеми аналізу забарвлення «H DAB» (гематоксилін+DAB) для визначення площі структури в ІГХ препаратах та оптичної (денситометричної) інтенсивності імунофарбування за запатентованою методикою (Пат. 99314 Україна, МПК 2015. G01N 21/00, G06K 9/00. Спосіб фотоцифрової морфометрії імуногістохімічних препаратів). Для морфометричного вимірювання кількісного вмісту компонентів використовували автоматично побудовану гістограму 8-бітного напівтонального зображення відфільтрованого DAB-каналу з програмним обчисленням оптичної щільності і стандартного відхилення. Для подальшого морфометричного вимірювання відносної площі в напівтональному зображенні додатково встановлювали стандартний поріг чутливості (інструмент Threshlod) – Default для обчислення експресії  $\alpha$ -SMA, колагену I і Reniy Entropy – для обчислення експресії десміну і фібронектину.

### Результати досліджень

Виконана оцінка результатів комплексного патогістологічного та ІГХ дослідження препаратів ПЗ, отриманих під час оперативних втручань з приводу ХП з панкреатичною та біліарною гіпертензією у 72 пацієнтів.

Весь матеріал було поділено на дві групи дослідження: група 1 («рання хірургія») – пацієнти, що вважали себе хворими на ХП до операції упродовж менше трьох років, та група 2 («пізня хірургія») – пацієнти, що вважали себе хворими на ХП більше трьох років. До групи 1 зараховано 32 пацієнти, до групи 2 – 40 пацієнтів.

Згідно з гістологічною класифікацією фіброзу за Metavir в групі 1 («рання хірургія») фіброз F1 (початковий) виявлено у 12

sue biopsy samples obtained during surgery (in most cases, histological material was taken from the head of the pancreas). Tissue samples were collected and processed following standard protocols, fixed in a 10% neutral formalin solution, embedded in paraffin, and stained with hematoxylin and eosin. Histological sections, four  $\mu\text{m}$  thick, were prepared using a rotary microtome (Microm HM-340E, Thermo Fischer Scientific Inc., MA, USA) and placed on adhesive glass slides (SuperFrost Plus; Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany) for immunohistochemical (IHC) analysis. IHC analysis was conducted following standard protocols using monoclonal mouse antibodies: smooth muscle actin (Clone 1A4) targeting alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and desmin (Clone D33) targeting desmin (DAKO, USA); rabbit monoclonal antibodies (Clone RAH C11) against type I collagen (Imtek, Russia); and rabbit polyclonal antibodies against fibronectin (DAKO, USA). After deparaffinization, high-temperature antigen retrieval in Tris-EDTA buffer (pH=9.0), and blocking of endogenous peroxidase activity with 3% hydrogen peroxide, incubation with primary antibodies was performed according to the manufacturer's instructions, followed by visualization of the IHC reaction with diaminobenzidine (DAKO, USA). The results of the IHC reaction were evaluated using an Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany) and a C5060WZ digital camera (Olympus, Japan). For the photomorphometric study, ten fields of view were photographed for each case. To standardize the data, photographs were taken under controlled conditions: a microscope magnification of  $\times 200$ , warm white light at 3200 K, camera settings of F3.2 (aperture), 1/400 (shutter speed), ISO 100 (sensitivity), and manual white balance adjustment. Quantitative analysis of the intensity levels and relative area of expression of the investigated stromal markers was conducted using ImageJ v.1.48 digital image processing software with the built-in color deconvolution plugin and the H-DAB (hematoxylin + diaminobenzidine) staining analysis scheme to measure the surface area of structures in IHC preparations and the optical (densitometric) immunostaining intensity, following a patented method (Patent No. 99314, Ukraine, IPC 2015: G01N 21/00, G06K 9/00, Method of Photo Digital Morphometry of Immunohis-

tochemical Preparations). An automatically generated histogram of the 8-bit grayscale image from the filtered DAB channel was used for quantitative morphometric analysis of the components, along with software-based calculations of optical density and standard deviation. For further morphometric calculation of the relative surface area in the grayscale image, a standard sensitivity threshold (Threshold tool) was applied, with the Default setting used for calculating the expression of  $\alpha$ -SMA and type I collagen, and Rényi entropy applied for calculating the expression of desmin and fibronectin.

## Results

The results of comprehensive pathohistological and IHC studies of pancreatic tissue samples obtained during surgeries for CP and pancreatic and biliary hypertension in 72 patients were evaluated.

The entire sample was divided into two study groups: Group I ("early surgery") included 32 patients diagnosed with CP less than three years before surgery, and Group 2 ("late surgery") comprised 40 patients diagnosed with CP more than three years before.

According to the METAVIR scoring system, the severity of fibrosis in Group I ("early surgery") was as follows: twelve (37.5%) patients had mild fibrosis (F1), sixteen (50.0%) patients had moderate fibrosis (F2), three (9.3%) patients had severe fibrosis (F3), and one (3.2%) patient had cirrhosis (F4). In Group II ("late surgery"), moderate fibrosis (F2) was observed in three (7.5%) patients, severe fibrosis (F3) in twenty-eight (70.0%) patients, and cirrhosis (F4) in nine (22.5%) patients. Three patients with CP and F3 fibrosis and one with F4 fibrosis were excluded from Group I, while three patients with CP and F2 fibrosis were excluded from Group II.

Histological examination (hematoxylin and eosin staining) of tissue samples from Group I patients with F1 fibrosis revealed mild interlobular fibrosis. The interlobular spaces exhibited slight expansion with no notable histological remodeling or tubule destruction, and the acinar tissue remained intact (Fig.1-A).

Parallel histochemical analysis using Mallory's trichrome and Van Gieson's staining tech-

(37.5 %) осіб, фіброз F2 (помірний) – у 16 (50.0 %) осіб, фіброз F3 (виразний) – у 3 (9.3 %) осіб, фіброз F4 (фіброз/цироз) – у 1 (3.2 %) особи, а в групі 2 («пізня хірургія») – фіброз F2 (помірний) виявлено у 3 (7.5 %) осіб, фіброз F3 (виразний) – у 28 (70.0 %) осіб, фіброз F4 (фіброз/цироз) – у 9 (22.5 %) осіб. З групи 1 вилучено трьох пацієнтів з ХП з фіброзом F3 і одного пацієнта з фіброзом F4, а з групи 2 – трьох пацієнтів з ХП з F2 (помірним ступенем фіброзу).

При гістологічному (забарвлення гематоксилином та еозином) дослідженні препаратів пацієнтів групи 1 з F1 ступенем фіброзу ПЗ було встановлено розвиток інтерлобулярного фіброзу слабкого ступеня виразності, інтерлобулярні простори мали несуттєве розширення, без гістологічної перебудови або руйнування тубул, ацинарна тканина залишалася інтактною (рис. 1-А).

Одночасне гістохімічне дослідження (забарвлення Малорі-трихром та Ван-Гізон) дало змогу візуалізувати розвиток тонких колагенових волокон у міждолькових перетинках, які оточували поодинокі дольки.

Вже на ранніх стадіях ХП з панкреатичною та біліарною гіпертензією в мікропрепаратах у зонах фіброзу простежувалася запальна інфільтрація лімфогістіоцитарними клітинами (лімфоцити, макрофаги, плазматичні клітини).

При комплексному патогістологічному дослідженні пацієнтів першої групи при ХП з панкреатичною та біліарною гіпертензією з F2 ступенем фіброзу було виявлено перебудову гістоархітекtonіки ПЗ не тільки у стромальному паттерні, але і у залозисто-протоковому паттерні. Простежувався значний розвиток перилобулярного та дифузного інтерлобулярного фіброзу навколо дольок ПЗ. У препаратах помічено перидуктальний фіброз, який муфтоподібно охоплював спотворенні та розширені міждолькові протоки.

Очевидним було збільшення розмірів міждолькового простору та септ. Інфільтрація запальними клітинами простежувалася у стромальному паттерні слабкого та помірного ступеня.

Суттєвою відмінністю ХП з F2 ступенем фіброзу від ХП з F1 є наявність щільного фіброзу навколо нервових волокон, що за клінічними даними може проявлятися больовим синдромом. При цьому ацинарна тканина ПЗ при F1 та F2 ступенях фіброзу залишається інтактною. Фібротичні зміни у всіх досліджених хворих групи «рання хірургія» були характерні поєднанням чітко окресленого перилобулярного фіброзу, що охоплював усі часточки, поширеного інтралобулярного фіброзу, а також виразного перидуктального фіброзу біля великих чоткоподібно звужених і кістозно-розширених протоків (рис. 1-Б).

Одночасне ІГХ дослідження з використанням  $\alpha$ -SMA мікропрепаратів пацієнтів, хворих на ХП зі слабким та помірним ступенем фіброзу (перша група) засвідчило, що ПЗК, які в нормі перебувають у стані спокою навколо ГПП та інших протоків, були активовані і продукували колаген та інші протеїни екстрацелюлярного матриксу.  $\alpha$ -SMA + ПЗК – є головними індукторами формування щільного фіброзу при ХП та синтезують достатній об'єм білків екстрацелюлярного матриксу (фібронектин, колаген I, III, IV типів), білків проміжних мікрофіламентів (десмін та віментин).

Також імуно-позитивними клітинами на  $\alpha$ -SMA були фібробласти, які становили основу фіброзної маси ПЗ при ХП. Експресія маркерів була у вигляді дифузного мембрано-цитоплазматичного забарвлення ПЗК та фібробластів. Рівень експресії  $\alpha$ -SMA (рис. 1-В) в групі «рання хірургія» становив  $(39.73 \pm 1.96)$  умовних одиниць оптичної щільності (УООЩ), рис. 1-В, а відносна площа імуно-позитивно забарвлених клітин строми –  $(15.84 \pm 0.61 \%)$ .

ІГХ дослідження мікропрепаратів з використанням колагену I типу виявило дифузне мембрано-цитоплазматичне забарвлення веретеноподібних клітин, що становлять базис стромального паттерну при ХП. Експресія маркера простежувалася як тонкі прожилки. Показник відносної площі імуно-позитивно забарвлених «фібрилярних» волокон має низький ступінь  $(22.70 \pm 1.4 \%)$ . При цьому рівень експресії маркера був помірний і становив  $(84.11 \pm 2.24)$  УООЩ (рис. 2).

niques demonstrated the presence of thin collagen fibers in the interlobular septa surrounding individual lobules.

Histological examination of tissue samples revealed inflammatory infiltration by lymphohistiocytic cells (lymphocytes, macrophages, plasma cells) in the fibrotic areas at the early stages of CP with pancreatic and biliary hypertension.

Comprehensive pathohistological analysis of Group I patients with CP, pancreatic and biliary hypertension, and F2 fibrosis revealed histoarchitectural remodeling of the pancreas, affecting both the stromal and glandular-ductal patterns. Significant perilobular and diffuse interlobular fibrosis were observed around pancreatic lobules. The preparations showed cuff-like periductal fibrosis surrounding the distorted and dilated interlobular ducts.

The interlobular space and septa were enlarged, and inflammatory cell infiltration was observed in the stromal pattern, ranging from mild to moderate intensity.

A notable distinction between CP with F2 fibrosis and CP with F1 fibrosis is the presence of dense fibrosis surrounding the nerve fibers, which, according to clinical findings, may be associated with the development of pain syndrome. However, in both F1 fibrosis and F2 fibrosis, the pancreatic acinar tissue remains intact. In all patients of the "early surgery" group, fibrotic changes were characterized by pronounced perilobular fibrosis affecting all lobules, widespread intralobular fibrosis, and prominent periductal fibrosis surrounding large, sharply narrowed, and cystically dilated ducts (Fig. 1-B).

Parallel IHC analysis using  $\alpha$ -SMA on tissue samples from Group I patients with CP and mild to moderate fibrosis revealed that PSCs, typically quiescent around the MPD and other ducts, were activated and produced collagen and other extracellular matrix proteins. PSCs and  $\alpha$ -SMA are central to developing dense fibrosis in CP, synthesizing abundant extracellular matrix proteins, including fibronectin and types I, III, and IV collagen, and intermediate filament proteins, such as desmin and vimentin.

Additionally,  $\alpha$ -SMA-positive cells included fibroblasts, which formed the primary fibrotic mass in

the pancreas in CP. Marker expression appeared as diffuse membrane and cytoplasmic staining in PSCs and fibroblasts. In the "early surgery" group, the expression level of  $\alpha$ -SMA (Fig. 1-C) was  $(39.73 \pm 1.96)$  optical density units (ODU), and the relative area of  $\alpha$ -SMA-positive stromal cells was  $(15.84 \pm 0.61)\%$  (Fig. 2).

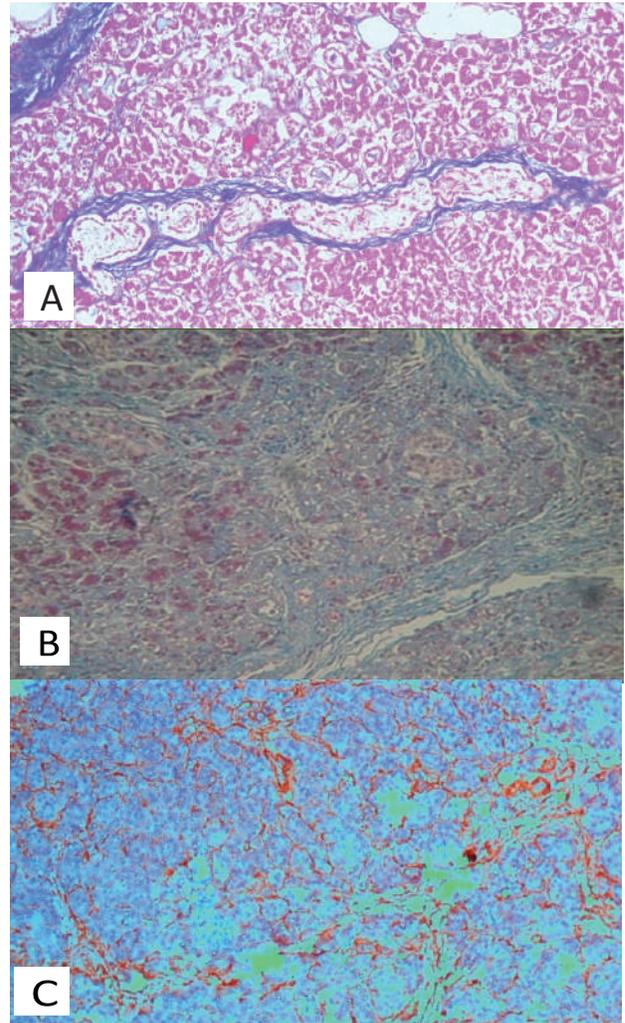


Figure 1. A-Pancreas of a Group I patient ("early surgery") with F1 fibrosis, showing minimal changes, including mild interlobular fibrosis. Masson's trichrome staining, magnification  $\times 400$ ; B- Pancreas of a Group I patient ("early surgery") showing signs of fibrotic transformation. Perilobular fibrosis with connective tissue strands extending into the pancreatic lobules, distorting the typical acinar structure. Mallory's trichrome staining, magnification  $\times 400$ ; C-Immunohistochemical reaction with Mo  $\alpha$ -Hu Smooth Muscle Actin Alpha antibodies in Group I ("early surgery"). Magnification  $\times 200$ . Weak staining of pancreatic stellate cells and their processes for  $\alpha$ -SMA.

IHC analysis of tissue samples using type I collagen revealed diffuse membrane and

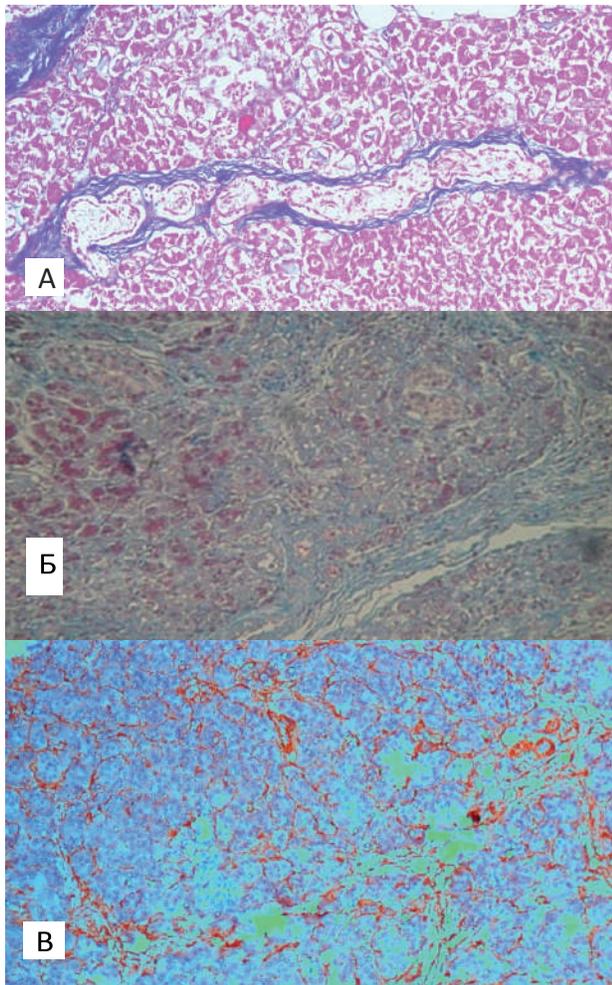


Рисунок 1. А – Підшлункова залоза пацієнта 1 групи («рання хірургія»), ступінь фіброзу F1. Мінімальні зміни у вигляді слабого інтерлобулярного фіброзу. Фарбування Масон-трихром, збільшення x400; Б – Підшлункова залоза пацієнта 1 групи («рання хірургія») з ознаками фіброзної трансформації. Перилобулярний фіброз, тяжі сполучної тканини проникають вглиб дольок підшлункової залози, спотворюючи характерну ацинарну будову. Фарбування Малорі-трихром, збільшення x400; В – Імуногістохімічна реакція з антитілами Mo  $\alpha$ -Hu Smooth Muscle Actine Alpha в 1 групі («рання хірургія»), збільшення x200. Слабке забарвлення панкреатичних зірчастих клітин та їх відростків на  $\alpha$ -SMA

За результатами кореляційного аналізу було встановлено наявність зворотного зв'язку між  $\alpha$ -SMA+ клітинами та рівнем експресії колагену I типу ( $r = -0.19, p < 0.05$ ). Прямий помірний кореляційний зв'язок встановлено між відносними площами  $\alpha$ -SMA+ клітинами та колагеном I типу ( $r = 0.42, p < 0.05$ ).

Застосовували стромальний маркер Fibronectin, який зв'язується з фібронек-

тином, що синтезується як фібрилярна сітка нерозчинної консистенції клітинами паренхіми та строми ПЗ. Його основна локалізація – клітинна поверхня та екстрацелюлярний матрикс. Експресія була як дифузне мембрано-цитоплазматичне коричневе забарвлення у веретеноподібних клітинах строми, що формують фіброзні муфти навколо нервових волокон та протоків. Експресія фібронектину також простежувалася як коричневе дифузне мембранне забарвлення в ацинарно-протоковій метаплазії та трансформованих ацинарних клітинах, що утворюють «тубулоподібні» комплекси. У групі «рання хірургія» простежувався помірний рівень експресії фібронектину, становлячи в середньому ( $29.43 \pm 2.69$ ) УООЩ. Площа імуно-позитивно забарвлених клітин на фібронектин становила ( $10.45 \pm 0.89$  %). ІГХ реакція із десміном у стромальному паттерні була подібна експресії  $\alpha$ -SMA (рис. 3).

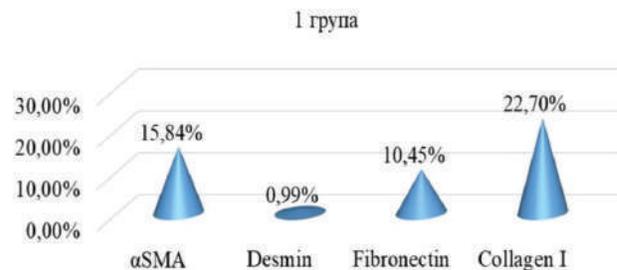


Рисунок 2. Показники медіан відносної площі експресій мезенхімальних маркерів у дослідженнях 1 групи («рання хірургія»)

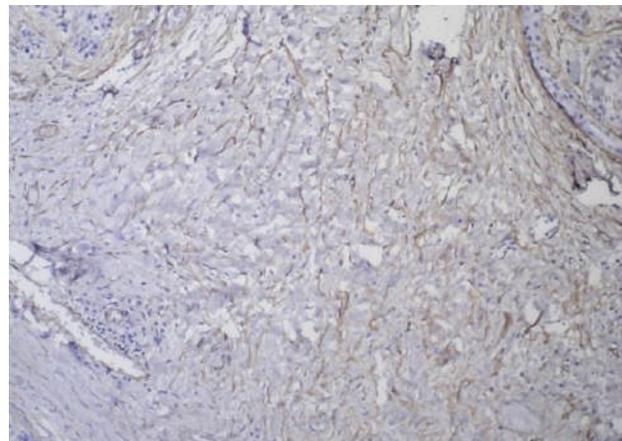


Рисунок 3. Імуногістохімічна реакція з використанням десміну в 1 групі («рання хірургія»), збільшення x200. Слабка експресія десміну в сполучній тканині

cytoplasmic staining in spindle- like cells, constituting the stromal pattern in CP. Marker expression appeared as thin strands. The relative area of positively stained  $\square$ fibrillar $\square$  fibers was low, measuring  $(22.70 \pm 1.4)\%$ . In contrast, the marker expression level was moderate, reaching  $(84.11 \pm 2.24)$  ODU (Fig. 2).

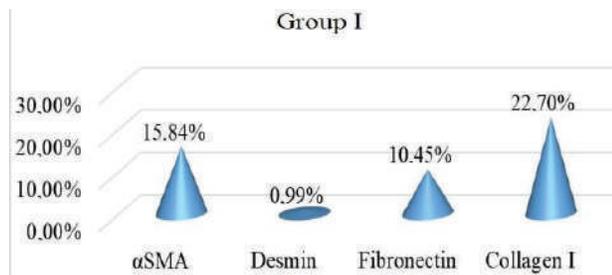


Figure 2. Median values of the relative area of mesenchymal marker expression in Group I ("early surgery").

Correlation analysis revealed an inverse correlation between  $\alpha$ -SMA+ cells and the expression level of type I collagen ( $r = -0.19$ ,  $p < 0.05$ ). A direct moderate correlation was observed between the relative areas of  $\alpha$ -SMA+ cells and type I collagen ( $r = 0.42$ ,  $p < 0.05$ ).

The stromal marker fibronectin was used, which binds to fibronectin synthesized as an insoluble fibrillar network by the parenchymal and stromal cells of the pancreas. Its primary localization is the cell surface and extracellular matrix. Expression appeared as diffuse brown

staining in the membrane and cytoplasm of spindle-shaped stromal cells forming fibrous sheaths around nerve fibers and ducts. Fibronectin expression was also observed as diffuse brown membrane staining in acinar-to-ductal metaplasia and in transformed acinar cells forming tubular complexes. In the  $\square$ early surgery $\square$  group, a moderate level of fibronectin expression was observed, with an average of  $(29.43 \pm 2.69)$  ODU. The area of fibronectin-positive cells was  $(10.45 \pm 0.89)\%$ . The IHC reaction with desmin in the stromal pattern closely resembled the expression of  $\alpha$ -SMA (Fig. 3).

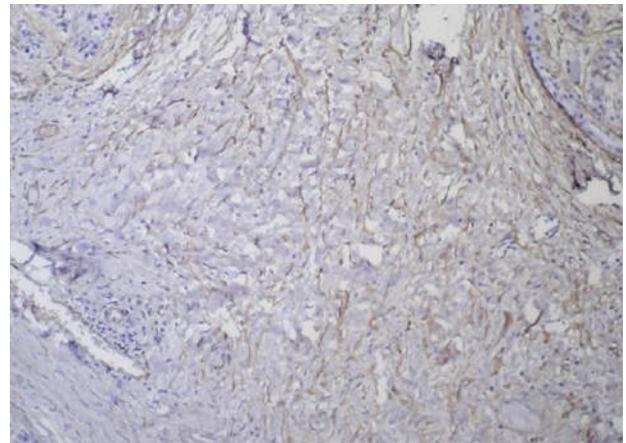


Figure 3. Immunohistochemical reaction using desmin in Group I ("early surgery"). Magnification  $\times 200$ . Weak desmin expression in the connective tissue. The similarity between the IHC reaction with desmin and  $\alpha$ -SMA expression is that desmin is synthesized by both extracellular matrix cells and PSCs. Desmin expression was observed in both the stroma and acinar tissue. In Group

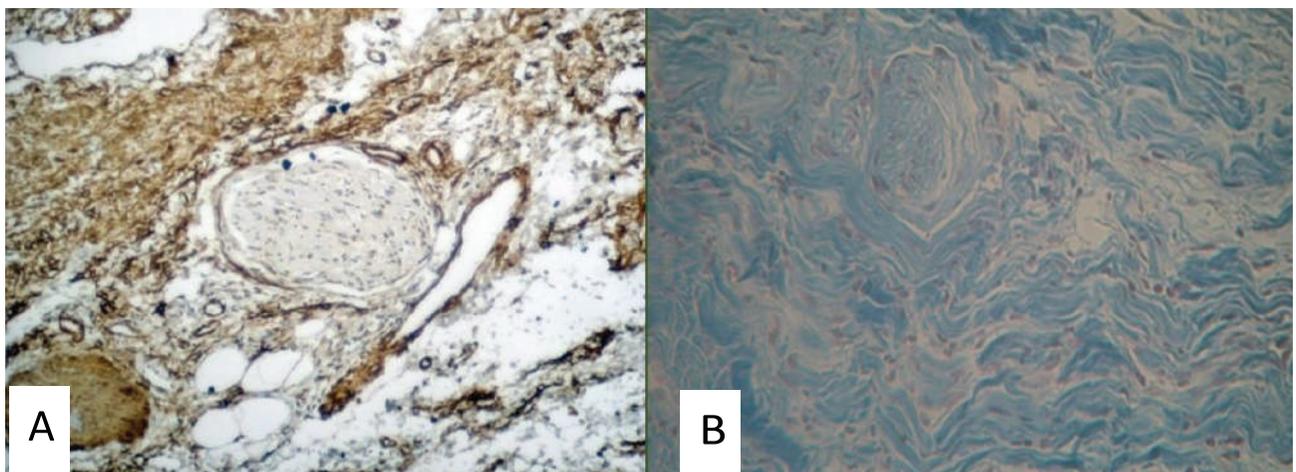


Figure 4.A- Immunohistochemical reaction with Mo a-Hu Fibronectin antibodies. Magnification  $\times 200$ . Perineural fibrosis of the pancreas in a Group II patient ("late surgery"); B-Perineural fibrosis of the pancreas in a Group II patient ("late surgery"). Mallory's trichrome staining, magnification  $\times 200$

Подібність ІГХ реакції із десміном експресії  $\alpha$ -SMA обумовлена тим, що десмін синтезують не тільки клітини екстрацелюлярного матриксу, але й ПЗК. Експресія десміну простежувалася не тільки у стромі, але й в ацинарній тканині. Рівень експресії десміну у першій групі був означений слабким дифузним мембрано-цитоплазматичним забарвленням клітин і становив ( $3.72 \pm 0.24$ ) УООЩ. Показник відносної площі експресії десміну ( $0.99 \pm 0.05$  %).

Суттєві зміни в архітектоніці ПЗ при ХП з панкреатичною та біліарною гіпертензією простежували при F3 та F4 ступенях виразності фіброзу при забарвленні гематоксилином та еозином, методом Малорі-трихром та Ван-Гізон. Стромальний паттерн превалював над паренхіматозним. У 18 (45 %) пацієнтів другої групи було помічено комбінований фіброз: інтерлобулярний, перилобулярний, інтралобулярний, периневральний та периваскулярний фіброз. У досліджуваних препаратах також простежувалася периневральна інфільтрація, що потенційно посилює больову реакцію (рис. 4-А, Б).

Також виявлено муфтоподібний фіброз навколо спотворених, кістозно-розширених міждолькових проток. Ацинарна тканина заміщена фіброзно-колагеновими тяжами сполучної тканини. У мікропрепаратах виявлено звивистість, спотворення та розширення протоків з ретенційними кістами, що не простежувалося у пацієнтів групи 1 зі слабким та помірним ступенем виразності фіброзу. Окрім екзокрин-

ної частини ПЗ при ХП з важким ступенем фіброзу та цирозом, було виявлено як збереження (рис. 5-А), так і цілковите ураження ендокринної частини – острівців Лангерганса з характерним фіброзом при майже повному заміщенні ацинарної тканини ПЗ сполучною тканиною збережених дрібних протоків та звужених головних протоків (рис. 5-Б).

Виявлено також вогнища компенсаторної ацинарно-протокової метаплазії. У цих вогнищах простежувалася трансформація поодиноких клітин ацинарної тканини у клітини протокового епітелію із формуванням дрібних тубулоподібних структур, що вистелені одним шаром кубічного епітелію з дрібним просвітом усередині, ядра нормохромні, цитоплазма еозинофільна, фігур мітозу не виявлено.

Тубулоподібні структури формували вогнища – дрібні тубулярні комплекси. Міждолькові протоки були значно розширені, у просвітах виявлено білкові пробки. Збільшення кількості гілок проток при морфологічному дослідженні визначали як зростання проток за двома основними типами, характерними для фіброзування інших паренхіматозних органів: продовжене з формуванням великої кількості паралельних гілок дрібного та середнього діаметру.

Через обструкцію протоків білковими пробками та стриктурами, спричиненими фіброзом ГПП, протоковий епітелій мав вогнища панкреатичної інтраепітеліальної неоплазії 1–2 ступеня.

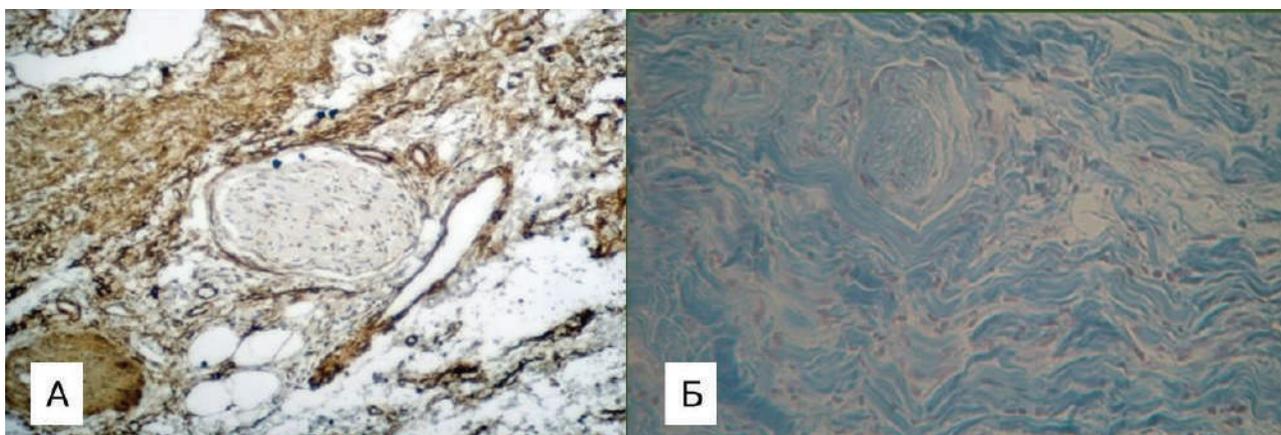


Рисунок 4. А – Імуногістохімічна реакція з антитілами Мо  $\alpha$ -Hu Fibronectin, збільшення  $\times 200$ . Периневральний фіброз підшлункової залози пацієнта 2 групи («пізня хірургія»); Б – Периневральний фіброз підшлункової залози пацієнта 2 групи («пізня хірургія»). Фарбування Малорі-трихром, збільшення  $\times 200$

I, desmin expression was characterized by weak diffuse membrane and cytoplasmic staining, with an average of  $(3.72 \pm 0.24)$  ODU. The relative area of desmin expression was  $(0.99 \pm 0.05)\%$ .

Significant changes in the pancreatic architecture in CP with pancreatic and biliary hypertension were observed in F3 and F4 fibrosis, using hematoxylin and eosin staining, Mallory's trichrome method, and Van Gieson's staining. The stromal pattern prevailed over the parenchymal pattern. In 18 (45%) Group II patients, combined fibrosis was observed, including interlobular, perilobular, intralobular, perineural, and perivascular fibrosis. Additionally, perineural infiltration was found in the specimens, potentially exacerbating the pain response (Fig.4-A, B).

A fibrous sheath was also observed around the distorted, cystically dilated interlobular ducts. Extensive fibrous collagen strands of connective tissue replaced the acinar tissue. The preparations showed tortuosity, distortion, and dilation of the ducts with retention cysts, which were not observed in Group I patients with mild to moderate fibrosis. In addition to the exocrine portion of the pancreas, CP with severe fibrosis and cirrhosis exhibited both preservation (Fig. 5-A) and complete involvement of the endocrine portion, specifically the islets of Langerhans. The latter was affected by fibrosis, with nearly complete replacement of the acinar tissue of the pancreas by connective tissue, preserving the small ducts and narrowing the main ducts (Fig. 5-B).

Foci of compensatory acinar-to-ductal metaplasia were observed, where individual acinar cells transformed into ductal epithelial cells. These foci formed small tubular structures lined by a single layer of cuboidal epithelium with a narrow lumen. The nuclei were normochromic, the cytoplasm was eosinophilic, and mitotic figures were absent.

Tubular structures formed foci of small tubular complexes. The interlobular ducts exhibited significant dilation, with protein plugs observed in the lumens. Morphological analysis revealed an increase in the number of duct branches, characterized by ductal enlargement into two main patterns typical of

fibrosis in other parenchymal organs: elongation of ducts and the formation of numerous parallel branches of small and medium diameter.

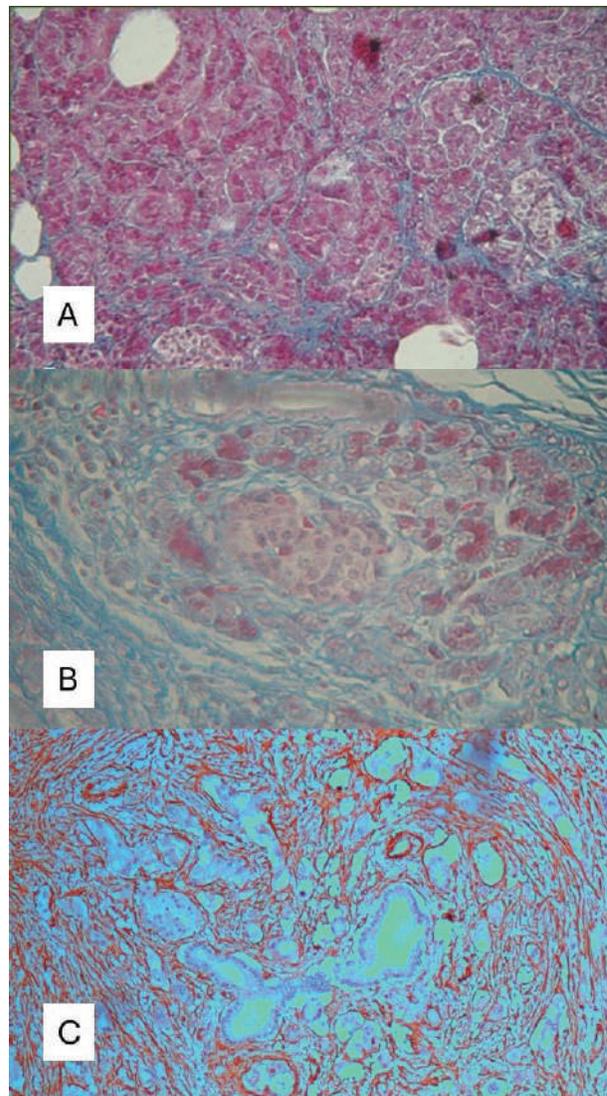


Figure 5. A- Interlobular fibrosis and disruption of the acinar architecture, with intact islets of Langerhans, in a Group II patient ("late surgery"). Mallory's trichrome staining, magnification  $\times 200$ ; B- Connective tissue infiltration of the islets at the site of a destroyed lobule in a Group II patient ("late surgery"). Mallory's trichrome staining, magnification  $\times 400$ ; C- Immunohistochemical reaction with Mo a-Hu Smooth Muscle Actin Alpha antibodies. Magnification  $\times 200$ . Intensive staining of pancreatic stellate cells and their processes for  $\alpha$ -SMA in Group II ("late surgery")

The ductal epithelium exhibited foci of grade 1 to grade 2 pancreatic intraepithelial neo-

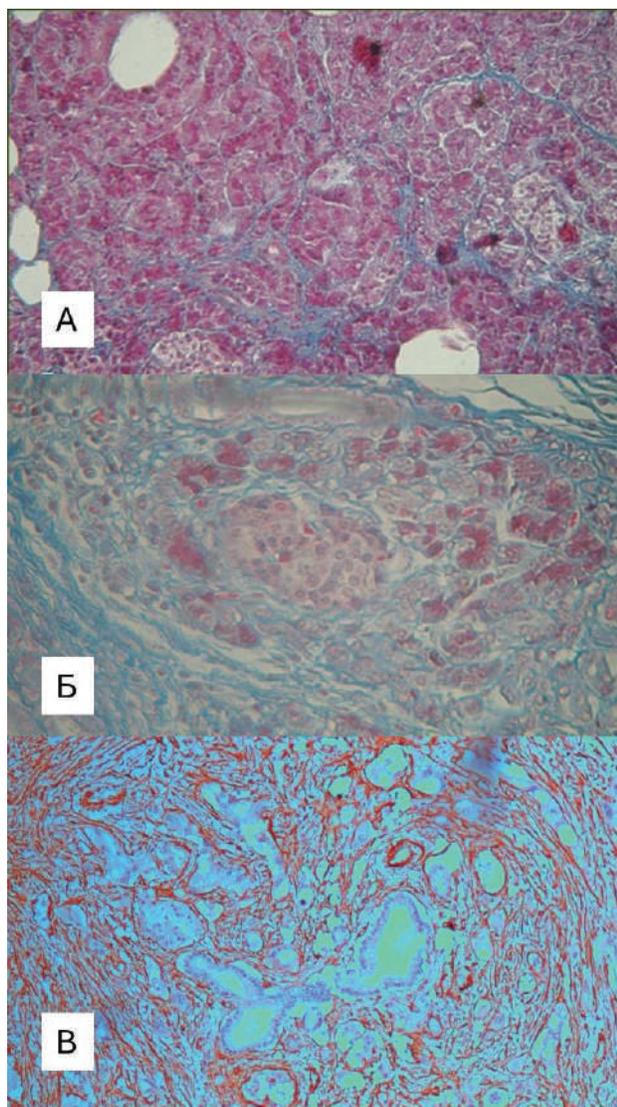


Рисунок 5. А – Інтралобулярний фіброз, порушення ацинарної будови, але з інтактними острівцями Лангерганса у пацієнта 2 групи («пізня хірургія»). Забарвлення Малорі-трихром, збільшення  $\times 200$ ; Б – На місці зруйнованої дольки сполучна тканина у пацієнта 2 групи («пізня хірургія») проникає вглиб острівців. Забарвлення Малорі-трихром, збільшення  $\times 400$ ; В – Імуногістохімічна реакція з антитілами Мо  $\alpha$ -Hu Smooth Muscle Actine Alpha, збільшення  $\times 200$ . Інтенсивне забарвлення панкреатичних зірчастих клітина та їх відростків на  $\alpha$ -SMA в 2 групі («пізня хірургія»).

ІГХ реакція з маркером  $\alpha$ -SMA у мікропрепаратах дослідження групи «пізня хірургія» засвідчила, що експресія маркера  $\alpha$ -SMA ПЗК мала більшу інтенсивність та відносну площу забарвлення у стандартизованих полях зору (рис. 5-В). Як і у першій групі дослідження, експресія  $\alpha$ -SMA удругій групі простежувалася як дифузне

мембрано-цитоплазматичне забарвлення ПЗК та фібробластів.

Рівень забарвлення  $\alpha$ -SMA + ПЗК становив ( $47.17 \pm 3.52$ ) УООЩ (рис. 6), що порівняно з рівнем експресії в першій групі більше у 1.18 разів,  $p < 0.05$ .

Відносна площа експресії  $\alpha$ -SMA у групі 2 становила в середньому ( $18.45 \pm 1.30$  %), що також більше у 0.86 %,  $p < 0.05$ .

При ІГХ забарвленні мікропрепаратів на колагені І типу було виявлено дифузне мембрано-цитоплазматичне забарвлення веретеноподібних, фібробластоподібних клітин, що формують щільну кам'янисту консистенцію стромального паттерну при ХП з панкреатичною та біліарною гіпертензією. Показник рівня експресії маркера був помірного ступеня, становлячи в середньому ( $92.19 \pm 4.14$ ) УООЩ.

При порівнянні показників рівня забарвлення між групами дослідження встановлено збільшення медіани у 1.10 разів (у групі «пізня хірургія»,  $p < 0.05$ ). Показник відносної площі колагену І типу + «фібрилярних» волокон мав помірний ступінь – ( $27.96 \pm 1.99$  %.) При порівнянні відносних площин експресії колагену І типу в першій та другій групах було виявлено збільшення показника в групі 2, ( $p < 0.05$ ).

Щодо погіршення гістологічної картини ХП з панкреатичною та біліарною гіпертензією із важким ступенем фіброзу та цирозом ПЗ виявили підвищення інтенсивності забарвлення строми колагеном І типу та збільшенням його відносної площі експресії. Це обумовлювало щільний муфтоподібний фіброз навколо нервових закінчень, що клінічно проявлявся болем, перитубулярний фіброз, який стенозував просвіт протоків навколо «тубулоподібних» комплексів, а також периневральний та периваскулярний фіброз. Також експресія колагену І типу простежувалася не тільки в стромальному паттерні ХП, але й в ацинарній тканині тонкими прожилками в острівцях Лангерганса.

При ІГХ забарвленні мікропрепаратів фібронектином було виявлено експресію як дифузне мембрано-цитоплазматичне за-

plasia resulting from ductal obstruction by protein plugs and strictures due to pancreatic fibrosis.

The IHC reaction with the  $\alpha$ -SMA marker in tissue samples from the "late surgery" group showed that  $\alpha$ -SMA expression in PSCs exhibited greater intensity and a larger relative staining area in standardized fields of view (Fig. 5-C). In both study groups,  $\alpha$ -SMA expression was observed as diffuse membrane and cytoplasmic staining in PSCs and fibroblasts.

The expression level of  $\alpha$ -SMA+PSCs was  $(47.17 \pm 3.52)$  ODU (Fig. 6), which was 1.18 times higher compared to the expression level in Group I,  $p < 0.05$ .

In Group II, the relative area of  $\alpha$ -SMA expression averaged  $(18.45 \pm 1.30)\%$ , which was 0.86% higher than in Group I,  $p < 0.05$ .

IHC staining of tissue samples for type I collagen revealed diffuse membrane and cytoplasmic staining in spindle-shaped, fibroblast-like cells, forming a dense, stone-like stromal pattern in CP with pancreatic and biliary hypertension. The marker expression level was moderate, averaging  $(92.19 \pm 4.14)$  ODU.

The comparison of the staining levels between the study groups revealed a 1.10-fold increase in the median in the "late surgery" group ( $p < 0.05$ ). The relative area of type I collagen and "fibrillar" fibers showed a moderate level, averaging  $(27.96 \pm 1.99)\%$ . The comparison of the relative areas of type I collagen expression between study groups revealed an increase in Group II ( $p < 0.05$ ).

As the histological severity of CP with pancreatic and biliary hypertension progressed, accompanied by severe fibrosis and cirrhosis of the pancreas, there was a notable increase in the intensity of type I collagen staining in the stroma, along with an expansion in the relative area of its expression. This resulted in dense, cuff-like fibrosis around nerve endings, clinically presenting as pain, along with peritubular fibrosis that narrowed the ductal lumens around the tubular complexes and perineural and perivascular fibrosis. Type I collagen expression was observed in the stromal pattern of CP and the acinar tissue as thin strands within the islets of Langerhans.

IHC staining of tissue samples with fibronectin showed diffuse brown membrane and cytoplasmic expression in stromal cells forming interlobular, perilobular, and intralobular fibrosis and fibrosis surrounding the ducts and ductal epithelium, which developed as a compensatory response from acinar cells (acinar-to-ductal metaplasia). In Group II, fibronectin expression was also moderate, as in Group I, but with a 1.23-fold increase, averaging  $(36.18 \pm 3.39)$  ODU ( $p < 0.05$ ). The area of fibronectin-positive cells in Group II was  $(13.05 \pm 1.01)\%$ , which represented a statistically significant difference compared to Group I ( $p < 0.05$ ).

IHC analysis of tissue samples from the "late surgery" group revealed desmin expression in the stromal pattern around lobules, tubules, tubular complexes, perineurally, and in the acinar tissue cells. Desmin expression was characterized by a weak, diffuse membrane and cytoplasmic staining in cells, averaging  $(4.67 \pm 0.52)$  ODU. The relative area of desmin expression was low -  $(1.13 \pm 0.06)\%$ .

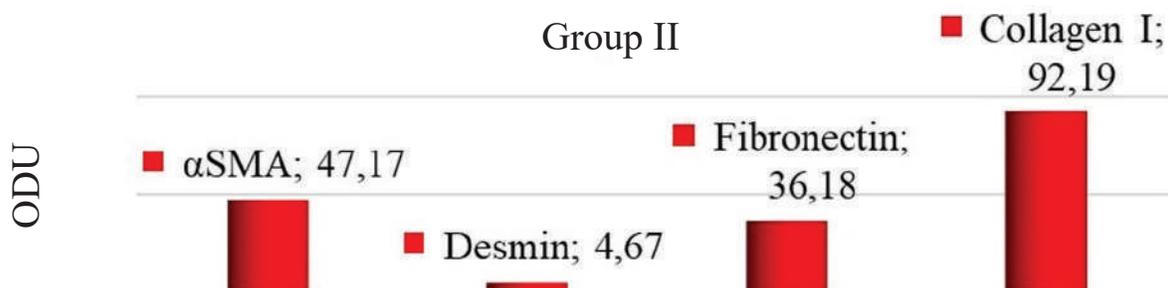


Figure 6. Median expression levels of mesenchymal markers in tissue samples from Group II ("late surgery")



Рисунок 6. Показники медіан рівня експресій мезенхімальних маркерів в дослідженнях 2 групи («пізня хірургія»)

барвлення коричневого кольору у клітинах строми, що формують інтерлобулярний, перилобулярний та інтралобулярний фіброз, фіброз навколо проток та протокового епітелію, сформованих компенсаторно з клітин ацинарної тканини (ацинарно-протокова метаплазія). У групі 2 виявлено також помірний рівень експресії фібронектину, як і в групі 1, але зі збільшенням у 1.23 рази та дорівнював у середньому ( $36.18 \pm 3.39$ ) УООЩ ( $p < 0.05$ ). Площа імунопозитивно забарвлених клітин на фібронектин в групі 2 становила ( $13.05 \pm 1.01$  %), що порівняно з групою 1 є статистично достовірною різницею ( $p < 0.05$ ).

При ІГХ дослідженні препаратів групи «пізня хірургія» було встановлено експресію десміну в стромальному паттерні навколо часточок, тубул, «тубулоподібних» комплексів, периневрально та в клітинах ацинарної тканини. Рівень експресії десміну вирізнявся слабким дифузним мембрано-цитоплазматичним забарвленням клітин і становив ( $4.67 \pm 0.52$ ) УООЩ. Показник відносної площі експресії десміну був слабого ступеня –  $1.13 \pm 0.06$  %.

### Обговорення та висновки

Ми встановили, що із прогресуванням формування фіброзу ПЗ та відкладанням терміну оперативного втручання при ХП з панкреатичною та біліарною гіпертензією, зростають показники рівня та відносної площі експресії відповідних маркерів фіброзу. З погіршенням ступеня фіброзу відбувається ущільнення строми, заміщення екзокринної та ендокринної частин ПЗ. Отже, пряме оперативне втручання на ПЗ у ранні терміни – до трьох років з початку симптомів ХП, має теоретичне обґрунтування з точки зору існування суб-

страту – паренхіми ПЗ, яка ще зберегла свою морфо-функціональну будову. Вогнища панкреатичної інтраепітеліальної неоплазії, виявлені у хворих на ХП, ще раз засвідчують, що ХП з панкреатичною та біліарною гіпертензією є факультативним передраковим станом. При цьому неоплазія починається саме з протокового епітелію, частіше з ГПП. Згодом це може призвести до розвитку протокової аденокарциноми ПЗ. Цей факт обґрунтовує виконання вірсунгектомії при хірургічному лікуванні ХП з панкреатичною та біліарною гіпертензією.

Встановлено важливу роль ПЗК у розвитку фіброзу ПЗ при ХП. Фіброзне ураження ПЗ є незворотним, а морфологічні і структурні зміни призводять до екзо- та ендокринних функціональних порушень ПЗ.

Виявлено, що експресія колагену I типу простежувалася в ацинарній тканині з тонкими прожилками в острівцях Лангерганса у терміни більше 3 років від початку клінічного прояву ХП. Встановлена інтраепітеліальна протокова неоплазія, яка згодом може призвести до розвитку протокової аденокарциноми ПЗ.

Доведено, що поліпшення результатів хірургічного лікування ускладнених форм ХП з біліарною та протоковою гіпертензією можливо досягти при плановому оперативному лікуванні у терміни розвитку ХП до трьох років, тобто, до виникнення незворотних патологічних процесів, включно із вірогідністю онкологічної трансформації ПЗ.

## Discussion and Conclusions

Our findings indicate that as pancreatic fibrosis progresses and the timing of surgical intervention in CP with pancreatic and biliary hypertension is delayed, there is a notable increase in the levels and relative area of expression of the relevant fibrosis markers. As fibrosis progresses, the stroma thickens, and the exocrine and endocrine portions of the pancreas are progressively replaced. Accordingly, direct surgical intervention on the pancreas within the early stages – up to three years from the onset of CP symptoms – is theoretically justified, as at this stage, the pancreatic parenchyma still retains its morpho-functional structure. Foci of pancreatic intraepithelial neoplasia observed in patients with CP further support the notion that CP with pancreatic and biliary hypertension is a premalignant condition. Notably, the neoplastic process originates in the ductal epithelium, most frequently from the MPD. Subsequently, this can result in the development of ductal adenocarcinoma of the pancreas. This underscores the rationale for performing pancreatic duct resection in the surgical management of CP with pancreatic and biliary hypertension.

An essential role of PSCs in developing pancreatic parenchymal fibrosis in CP has been established. Fibrotic lesions of the pancreas are irreversible, and the resulting morphological and structural changes lead to both exocrine and endocrine dysfunction.

More than three years after the onset of clinical manifestations of CP, type I collagen expression was observed in the acinar tissue, with thin strands detected within the islets of Langerhans. Intraepithelial ductal neoplasia was also identified, which may later progress to ductal adenocarcinoma of the pancreas.

It has been demonstrated that the improvement in surgical outcomes for complicated forms of CP with biliary and ductal hypertension is achieved through planned surgery within the first three years of CP development, before the onset of irreversible pathological changes, including the potential for oncological transformation of the pancreas.

## References

1. Drewes AM, Bouwense SAW, Campbell CM, Ceyhan GO, Delhaye M, Demir IE, et al. Guidelines for the understanding and management of pain in chronic pancreatitis. *Pancreatology*. 2017;17(5):720-731. doi: 10.1016/j.pan.2017.07.006
2. Olesen SS, Krauss T, Demir IE, Wilder-Smith OH, Ceyhan GO, Pasricha PJ, et al. Towards a neurobiological understanding of pain in chronic pancreatitis: mechanisms and implications for treatment. *Pain Rep*. 2017;2(6):e625. doi: 10.1097/PR9.0000000000000625.
3. Mou Y, Song Y, Chen HY, Wang X, Huang W, Liu XB, et al. Which Surgeries Are the Best Choice for Chronic Pancreatitis: A Network Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Front Surg*. 2021;8:798867. doi: 10.3389/fsurg.2021.798867
4. Yaroshenko LO. [Clinical and pathogenetic role of magnesium metabolic disorder and its correction in chronic pancreatitis combined with chronic bronchitis]. Danylo Halytsky Lviv National Medical University of the Ministry of Health Care of Ukraine, Lviv, 2016. Thesis. [In Ukrainian].
5. Ahmed S, Bradshaw AD, Gera S, Dewan MZ, Xu R. The TGF- $\beta$ /Smad4 Signaling Pathway in Pancreatic Carcinogenesis and Its Clinical Significance. *J Clin Med*. 2017;6(1):5. doi: 10.3390/jcm6010005
6. Choi JW, Lee SK, Kim MJ, Kim DG, Shin JY, Zhou Z, et al. Piperine ameliorates the severity of fibrosis via inhibition of TGF  $\beta$ /SMAD signaling in a mouse model of chronic pancreatitis. *Mol Med Rep*. 2019;20(4):3709-3718. doi: 10.3892/mmr.2019.10635
7. Qiao X, Li Y, Mai J, Ji X, Li Q. Effect of Dibutyltin Dilaurate on Triglyceride Metabolism through the Inhibition of the mTOR Pathway in Human HL7702 Liver Cells. *Molecules*. 2018;23(7):1654. doi: 10.3390/molecules23071654
8. Ammer-Herrmenau C, Ellenrieder V, Neesse A. [Chronic pancreatitis: update diagnostic and therapeutic concepts]. *Z Gastroenterol*. 2022;60(07):1131-1138. doi: 10.1055/a-1659-4636. [In German].
9. Bhatia R, Thompson CM, Clement EJ, Ganguly K, Cox JL, Rauth S, et al. Malondialdehyde-Acetaldehyde Extracellular Matrix Protein Adducts Attenuate Unfolded Protein Response During Alcohol and Smoking-Induced Pancreatitis. *Gastroenterology*. 2022;163(4):1064-1078.e10. doi: 10.1053/j.gastro.2022.06.071

### Список літератури

1. Drewes AM, Bouwense SAW, Campbell CM, Ceyhan GO, Delhaye M, Demir IE, et al. Guidelines for the understanding and management of pain in chronic pancreatitis. *Pancreatology*. 2017;17(5):720-731. doi: 10.1016/j.pan.2017.07.006
2. Olesen SS, Krauss T, Demir IE, Wilder-Smith OH, Ceyhan GO, Pasricha PJ, et al. Towards a neurobiological understanding of pain in chronic pancreatitis: mechanisms and implications for treatment. *Pain Rep*. 2017;2(6):e625. doi: 10.1097/PR9.0000000000000625.
3. Mou Y, Song Y, Chen HY, Wang X, Huang W, Liu XB, et al. Which Surgeries Are the Best Choice for Chronic Pancreatitis: A Network Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Front Surg*. 2021;8:798867. doi: 10.3389/fsurg.2021.798867
4. Yaroshenko LO. [Clinical and pathogenetic role of magnesium metabolic disorder and its correction in chronic pancreatitis combined with chronic bronchitis]. Danylo Halytsky Lviv National Medical University of the Ministry of Health Care of Ukraine, Lviv, 2016. Thesis. [In Ukrainian].
5. Ahmed S, Bradshaw AD, Gera S, Dewan MZ, Xu R. The TGF- $\beta$ /Smad4 Signaling Pathway in Pancreatic Carcinogenesis and Its Clinical Significance. *J Clin Med*. 2017;6(1):5. doi: 10.3390/jcm6010005
6. Choi JW, Lee SK, Kim MJ, Kim DG, Shin JY, Zhou Z, et al. Piperine ameliorates the severity of fibrosis via inhibition of TGF  $\beta$ /SMAD signaling in a mouse model of chronic pancreatitis. *Mol Med Rep*. 2019;20(4):3709- 3718. doi: 10.3892/mmr.2019.10635
7. Qiao X, Li Y, Mai J, Ji X, Li Q. Effect of Dibutyltin Dilaurate on Triglyceride Metabolism through the Inhibition of the mTOR Pathway in Human HL7702 Liver Cells. *Molecules*. 2018;23(7):1654. doi: 10.3390/molecules23071654
8. Ammer-Herrmenau C, Ellenrieder V, Neesse A. [Chronic pancreatitis: update diagnostic and therapeutic concepts]. *Z Gastroenterol*. 2022;60(07):1131-1138. doi: 10.1055/a-1659-4636. [In German].
9. Bhatia R, Thompson CM, Clement EJ, Ganguly K, Cox JL, Rauth S, et al. Malondialdehyde-Acetaldehyde Extracellular Matrix Protein Adducts Attenuate Unfolded Protein Response During Alcohol and Smoking- Induced Pancreatitis. *Gastroenterology*. 2022;163(4):1064–1078.e10. doi: 10.1053/j.gastro.2022.06.071
10. Ammann RW, Heitz PU, Klöppel G. The “two-hit” pathogenetic concept of chronic pancreatitis. *Int J Pancreatol*. 1999;25:251. doi: 10.1007/BF02925973
11. Ashraf, H., Colombo, J.P., Marcucci, V., Rhoton, J., & Olowoyo, O. (2021). A Clinical Overview of Acute and Chronic Pancreatitis: The Medical and Surgical Management. *Cureus*, 13(11), e19764. <https://doi.org/10.7759/cureus.19764>

10. Ammann RW, Heitz PU, Klöppel G. The "two-hit" pathogenetic concept of chronic pancreatitis. *Int J Pancreatol.* 1999;25:251. doi: 10.1007/BF02925973
11. Ashraf, H., Colombo, J.P., Marcucci, V., Rhoton, J., & Olowoyo, O. (2021). A Clinical Overview of Acute and Chronic Pancreatitis: The Medical and Surgical Management. *Cureus*, 13(11), e19764. <https://doi.org/10.7759/cureus.19764>