

УДК 616.366-002-076:611.366.018.61

РЕАКТИВНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ГЛАДКОЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ЖЕЛЧНОГО ПУЗЫРЯ В ДИНАМИКЕ РАЗВИТИЯ НЕКАЛЬКУЛЕЗНОГО ХОЛЕЦИСТИТА

© 2013 г. А. Л. Зашихин, А. Ю. Любезнова

Северный государственный медицинский университет, г. Архангельск

Характер и уровень метаболических изменений гладкой мышечной ткани (ГМТ) при развитии воспалительных процессов в различных отделах билиарной системы до настоящего времени остаются недостаточно изученными. Нарушение работы желчного пузыря является важным симптомом, отражающим моторную дисфункцию данного органа, которая имеет место как при остром, так и при хроническом типах холецистита [6, 13]. При этом о специфике реактивных изменений мышечного компонента стенки при развитии воспалительных явлений слизистой оболочки желчного пузыря имеются единичные данные [8]. Целью настоящей работы явилось исследование структурно-метаболических преобразований мышечного компонента различных отделов желчного пузыря при развитии некалькулезного холецистита. Также была поставлена задача выявления в гладких мышечных клетках экспрессии маркерных и неспецифических белков в динамике данного заболевания.

Методы

Исследована гладкая мускулатура в составе стенки различных отделов желчного пузыря морских свинок в норме и при развитии экспериментального холецистита. Работа проведена на 20 животных, которые были разделены на две группы: контрольную и экспериментальную. В экспериментальной группе животных разделяли по длительности развития некалькулезного холецистита (от 4 до 15 дней). Контрольная и каждая экспериментальная группа включала 5 животных. Использовалась стандартная модель хронического некалькулезного холецистита [9, 12, 14], которая состоит в лигировании проксимального отдела желчного протока. Данная методика является общепризнанной моделью получения острого некалькулезного холецистита, сопровождающегося воспалением и нарушением моторики желчного пузыря [1, 10]. Применялся наркоз препаратом Кетамин гидрохлорид из расчета 20 мг/кг. В ночь перед операцией животные были ограничены в еде и воде. Лабораторные животные выводились из эксперимента на 4, 7 и 15-е сутки. Исследование проводилось в соответствии с «Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных», а также с соблюдением правил гуманного обращения с животными (Report of the AVMA Panel on Euthanasia /AVMA, 2001) в соответствии с национальными и европейскими правилами и стандартами по уходу и содержанию лабораторных животных [4]. Полученные фрагменты стенки желчного пузыря помещались в 10 % и 4 % буферные растворы формалина при температуре 4 °С. На следующем этапе срезы обрабатывались по стандартной гистохимической методике для выявления коллагеновых структур резорцин-фуксином (по Маллори) для

С использованием комплекса общеморфологических, гистохимических и иммуногистохимических методов изучали реактивные изменения гладкой мышечной ткани желчного пузыря морских свинок в динамике развития острого некалькулезного холецистита. Исследование выявило в процессе развития данного заболевания воспалительные явления слизистой оболочки органа и последовательное нарастание коллагенового и эластического компонента межклеточного матрикса. Иммуногистохимический анализ показал, что при воспалительном процессе существенная роль в развитии коллагенового каркаса может принадлежать гладким мышечным клеткам, у которых наблюдается снижение экспрессии десмина и активация синтеза коллагена.

Ключевые слова: некалькулезный холецистит, коллагеновый и эластический компоненты, иммуногистохимический анализ

определения эластического компонента стенки, а также окрашивались на гематоксилин-эозин (рис. 1. Рис. 1—4 см. на внутренних сторонах передней и задней сторон обложки). Определение маркерных и неспецифических структур в составе гладкомышечной стенки желчного пузыря проводили с помощью иммуноклональных антител Desmin (в разведении 1:400, monoclonal produced in mouse, SIGMA) и C-kit (в разведении 1:100 polyclonal produced in rabbit IgG, Santa Cruz Biotechnology) (рис. 2).

Результаты

Общеморфологический анализ различных отделов интактной стенки желчного пузыря свидетельствует о том, что ГМТ в ее составе представляет собой сложные переплетающиеся комплексы гладких миоцитов, расположенные в продольном, поперечном и косом направлениях и разделенные тонкими прослойками соединительной ткани (рис. 3). Гистохимический анализ позволяет выявить наличие коллагеновых и эластических фибриллярных компонентов в различных отделах стенки желчного пузыря, количество которых в межклеточном матриксе в динамике развития холецистита значительно возрастает, достигая максимума к концу эксперимента (рис. 4). Наряду с этим на 7-е и 15-е сутки наблюдаются очаговые лейкоцитарные инфильтраты в составе слизистой оболочки всех исследованных отделов органа, что свидетельствует о развитии воспалительного процесса. Нам не удалось выявить существенных различий в распределении межклеточного фибриллярного компонента в составе различных отделов стенки желчного пузыря.

Проведенный иммуногистохимический анализ показал, что экспрессия маркерного белка гладких мышечных клеток (десмина) четко идентифицируется в интактном органе. К концу эксперимента наблюдается снижение данной реакции.

Иммуноцитохимический анализ экспрессии коллагена I типа в гладких мышечных клетках различных отделов интактного желчного пузыря не позволил выявить положительную реакцию на данный белок. Результаты дальнейших исследований свидетельствуют о том, что только на 15-е сутки эксперимента удается обнаружить экспрессию коллагена I типа в отдельных гладких миоцитах, расположенных в составе мышечных пластов [2] (рис. 4).

Обсуждение результатов

В динамике развития экспериментального некалькулезного холецистита отмечается формирование воспалительных явлений в составе различных отделов стенки желчного пузыря. При этом нам не удалось на светооптическом уровне выявить деструктивные изменения в составе гладкомышечного компонента стенки. Известно, что подавление активности мускариновых рецепторов при развитии воспаления слизистой желчного пузыря может служить одним из механизмов снижения индуцированной холецистокинином сократительной активности ГМТ при развитии острого холецистита [11].

Наши данные согласуются с результатами ряда исследователей о возрастании количества коллагена I и IV типа на 3-и сутки после перевязки протока [3]. Иммуноцитохимическая идентификация отдельных миоцитов, дающих позитивную реакцию на коллаген I типа, вероятно, свидетельствует о перестройке внутриклеточного белкового синтеза, обусловленного воспалительными изменениями слизистой оболочки. Рассматривая вопрос об иммуноцитохимической идентификации гладких миоцитов, экспрессирующих коллаген на последних сроках эксперимента, необходимо учитывать тот факт, что, по мнению ряда авторов, в условиях нарушения моторики желчного пузыря в процесс перестройки межклеточного матрикса могут включаться и миофибробласты [5]. При этом показано, что перевязка желчного протока у морских свинок ведет к нарушению контрактильной функции гладкомышечного компонента желчного пузыря. Также существуют данные, что механический стресс стимулирует активность клеток миофибробластического типа. Миофибробласты ответственны за образование ряда компонентов экстрацеллюлярного матрикса, включая коллаген I и III типа, а также эластина [7].

Таким образом, в процессе трансформации стенки желчного пузыря в динамике развития акалькулезного холецистита могут быть задействованы как механизмы активации миофибробластического диферона, так и направленные изменения экспрессии специфических белков гладких миоцитов, обуславливающие развитие склеротических процессов в стенке данного органа. Вопрос о роли миофибробластов при развитии изменений структуры стенки различных отделов билиарной системы требует дальнейшего исследования.

Список литературы

1. Bogar L. J., Bartula L. L., Parkman H. P., Myers S. I. Enhanced bradykinin-stimulated prostaglandin release in the acutely inflamed guinea pig gallbladder is due to new synthesis of cyclooxygenase 1 and prostacyclin synthase // J. Surg. Res. 1999. Vol. 84. P. 71–76.
2. Grinnell F., Zhu M., Carlson M. A., Abrams J. M. Release of mechanical tension triggers apoptosis of human fibroblasts in a model of regressing granulation tissue // Exp. Cell. Res. 1999. Vol. 248. P. 608–619.
3. Campbell J. H. and Campbell G. R. Smooth muscle phenotypic modulation - a personal experience // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2012. Vol. 32, N 8. P. 1784–1789.
4. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals / Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council. National Academy Press. Washington, D. C., 1996. P. 96–98.
5. Hinz B., Gabbiani G. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts // Curr. Opin. Biotechnol. 2003. Vol. 14. P. 538–546.
6. Horton J. D., Bilhartz L. E., Feldman M., Friedman L. S., Sleisenger M. H. Gallstone disease and its complications // Gastrointestinal and Liver Disease, Saunders, Philadelphia, 2002. P. 1065–1090.
7. Lorena D., Darby I. A., Reinhardt D. P., Sapin V., Rosenbaum J. Desmouliere Fibrillin-1 expression in normal

and fibrotic rat liver and in cultured hepatic fibroblastic cells: modulation by mechanical stress and role in cell adhesion // *Lab. Invest.* 2004. Vol. 84. P. 203–212.

8. Myers S. I., Evans C. E., Bartula L., Rivas A., Taylor-Kalley B., Evans C. Habeeb A. R. Increased gall-bladder prostanoid synthesis after bileduct ligation in the rabbit is secondary to new enzyme // *Biochem. J.* 1992. Vol. 1(288). Pt. 2. P. 585–590.

9. Myers S. I., Evans C. T., Inman L., Demian S., Bartula L., Taylor-Kalley B., Riva A., Hernandez R. Acute cholecystitis potentiates bradykinin stimulated fibroblast prostanoid release in the rabbit // *Mol. Cell. Endocrinol.* 1993. Vol. 95 (1-2). P. 129–138.

10. Myers S. I., Bartula L., Rivas A., Taylor-Kalley B., Evans C. E. Regulation of eicosanoid synthesis in fibroblasts from inflamed gallbladders // *Mol. Cell. Endocrinol.* 1995. I 15 (1) P. 29–39.

11. Parkman H. P., James A. N., Bogar L. J., Bartula L. L., Thomas R. M., Ryan J. P., Myers S. I. Effect of acalculous cholecystitis on gallbladder neuromuscular transmission and contractility // *Gastroenterology.* 2000. Vol. 88(2). P. 186–192.

12. Parkman H. P., Bogar L. J., Bartula L. L., Pagano A. P., Thomas R. M., Myers S. I. Effect of experimental acalculous cholecystitis on gallbladder smooth muscle contractility // *Dig. Dis. Sci.* 2011. Vol. 44(11). P. 235–243.

13. Ryan J. P., Yamada T. Motility of the biliary tree // *Textbook of Gastroenterology.* JB Lippincott, Philadelphia, 1991. P. 92–112.

14. Xiao Z. L., Chen Q., Biancani P., Behar J. Abnormalities of gallbladder muscle associated with acute inflammation in guinea pigs // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2001. N 281(2). P. 490–497.

References

1. Bogar L. J., Bartula L. L., Parkman H. P., Myers S. I. Enhanced bradykinin-stimulated prostaglandin release in the acutely inflamed guinea pig gallbladder is due to new synthesis of cyclooxygenase 1 and prostacyclin synthase. *J. Surg. Res.* 1999, vol. 84, pp. 71–76.

2. Grinnell F., Zhu M., Carlson M. A., Abrams J. M. Release of mechanical tension triggers apoptosis of human fibroblasts in a model of regressing granulation tissue. *Exp. Cell. Res.* 1999, vol. 248, pp. 608–619.

3. Campbell J. H. and Campbell G. R. Smooth muscle phenotypic modulation — a personal experience. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012, vol. 32, no. 8, pp. 1784–1789.

4. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.* Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council. National Academy Press. Washington, D. C., 1996, pp. 96–98.

5. Hinz B., Gabbiani G. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2003, vol. 14, pp. 538–546.

6. Horton J. D., Bilhartz L. E., Feldman M., Friedman L. S., Sleisenger M. H. *Gallstone disease and its complications. Gastrointestinal and Liver Disease,* Saunders, Philadelphia, 2002. P. 1065–1090.

7. Lorena D., Darby I. A., Reinhardt D. P., Sapin V., Rosenbaum J. Desmouliere Fibrillin-1 expression in normal and fibrotic rat liver and in cultured hepatic fibroblastic cells: modulation by mechanical stress and role in cell adhesion. *Lab. Invest.* 2004, vol. 84, pp. 203–212.

8. Myers S. I., Evans C. E., Bartula L., Rivas A., Taylor-Kalley B., Evans C. Habeeb A. R.. Increased gall-bladder

prostanoid synthesis after bileduct ligation in the rabbit is secondary to new enzyme. *Biochem. J.* 1992, vol. 1(288), pt. 2, pp. 585–590.

9. Myers S. I., Evans C. T., Inman L., Demian S., Bartula L., Taylor-Kalley B., Riva A., Hernandez R. Acute cholecystitis potentiates bradykinin stimulated fibroblast prostanoid release in the rabbit. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1993, vol. 95(1-2), pp. 129–138.

10. Myers S. I., Bartula L., Rivas A., Taylor-Kalley B., Evans C. E. Regulation of eicosanoid synthesis in fibroblasts from inflamed gallbladders. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1995, I 15(1), pp. 29–39.

11. Parkman H. P., James A. N., Bogar L. J., Bartula L. L., Thomas R. M., Ryan J. P., Myers S. I. Effect of acalculous cholecystitis on gallbladder neuromuscular transmission and contractility. *Gastroenterology.* 2000, vol. 88(2), pp. 186–192.

12. Parkman H. P., Bogar L. J., Bartula L. L., Pagano A. P., Thomas R. M., Myers S. I. Effect of experimental acalculous cholecystitis on gallbladder smooth muscle contractility. *Dig. Dis. Sci.* 2011, vol. 44(11), pp. 235–243.

13. Ryan J. P., Yamada T. Motility of the biliary tree. *Textbook of Gastroenterology.* JB Lippincott, Philadelphia, 1991, pp. 92–112.

14. Xiao Z. L., Chen Q., Biancani P., Behar J. Abnormalities of gallbladder muscle associated with acute inflammation in guinea pigs. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2001, no. 281(2), pp. 490–497.

GALLBLADDER'S SMOOTH MUSCLE TRANSFORMATION DURING DEVELOPMENT OF ACUTE ACALCULOSE CHOLECYSTITIS

A. L. Zashikhin, A. Yu. Lubeznova

Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russia

We have investigated reactivity of the smooth muscular tissue (SMT) of guinea pigs' gall bladders in dynamics of acute cholecystitis development. Complex morphological, histochemical and immunohistochemical analyses have been carried out. During the disease development, the study has shown increased inflammatory phenomena of the mucosa in all parts of the gall bladders and a successive increase of the collagenic and elastic components of the intercellular matrix. The immunohistochemical analysis has shown that positive reaction of the smooth muscle cells to collagen type I was identified on the 15th day of the experiment.

Thus, experimental dysfunction of the gall bladders caused reactive transformation of the SMT in which there was observed suppression of protein markers and activation of collagen synthesis.

Keywords: cholecystitis, collagenic and elastic components, immunohistochemical analysis

Контактная информация:

Зашихин Андрей Леонидович — доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес: 163000, г. Архангельск, пр. Троицкий, д. 51

Тел. (8182) 28-59-48

E-mail: profALZ@yandex.ru