

Н.М. Козлова, С.С. Голубев, Я.Л. Тюрюмин, Л.Ю. Раевская, Н.Г. Нестеров

ПОВЫШЕННАЯ ЭКСПРЕССИЯ ЦИКЛООКСИГЕНАЗЫ-2 В СТЕНКЕ ЖЕЛЧНОГО ПУЗЫРЯ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ КАЛЬКУЛЕЗНЫМ ХОЛЕЦИСТИТОМ*Иркутский государственный медицинский университет (Иркутск)
Иркутский областной клинический консультативно-диагностический центр (Иркутск)
НЦ РВХ ВСНЦ СО РАМН (Иркутск)*

Изучен уровень экспрессии циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2) в зависимости от степени выраженности воспаления в стенке желчных пузырей, полученных от больных хроническим калькулезным холециститом после холецистэктомии. Повышенная экспрессия ЦОГ-2 была определена в 81 % в эпителиальных клетках, в 86 % – в гладкомышечных, в 57 % – в стромальных клетках, в 71 % – в стенках сосудов, в 37 % – синусах Рокитанского-Ашоффа. Выявлена положительная корреляция между выраженностью воспаления в стенке желчного пузыря и выраженностью экспрессии ЦОГ-2 в гладкомышечных клетках и стенках сосудов.

Ключевые слова: экспрессия циклооксигеназы-2, хронический калькулезный холецистит, асептическое воспаление

THE INCREASE OF THE CYCLOOXYGENASE-2 EXPRESSION IN THE GALLBLADDER WALL OF PATIENTS WITH CHRONIC CALCULOUS CHOLECYSTITIS

N.M. Kozlova, S.S. Golubev, J.L. Turumin, L.Ju. Raevskaja, N.G. Nesterov

*Irkutsk State Medical University, Irkutsk
Regional Diagnostic Centre, Irkutsk
Scientific Center of Reconstructive and Restorative Surgery ESSC SB RAMS, Irkutsk*

The level of COX-2 expression in the gallbladder wall was studied depending on the degree of inflammation in the pts with CCC. The increase of COX-2 expression in the gallbladder wall was determined in 86 % of the smooth muscle cells, in 81 % of the epithelial cells, in 71 % of the vascular smooth muscle cells, in 57 % of the stromal cells and in 37 % of the Rokitansky-Aschoff sinuses. Positive correlations were revealed between the degree of inflammation in the gallbladder wall and the degree of COX-2 expression in the smooth muscle cells and in the vascular smooth muscle cells.

Key words: COX-2 expression, chronic calculous cholecystitis, aseptic inflammation

В настоящее время начало хронического некалькулезного холецистита связывают с развитием асептического воспаления в слизистой оболочке желчного пузыря (ЖП) [2].

Не вызывает сомнения тот факт, что некалькулезный холецистит представляет собой начальную стадию калькулезного холецистита, т.е. еще до развития камней в желчном пузыре уже обнаруживаются литогенные свойства желчи [1].

Циклооксигеназа-2 (ЦОГ-2) вовлечена в воспалительный ответ при хронических холециститах [11].

Повышение экспрессии циклооксигеназы-2 обнаружено в препаратах ЖП, полученных после холецистэктомии (ХЭ) при хронических холециститах, а также при экспериментальном остром холецистите [6, 8, 9, 12]. Степень экспрессии циклооксигеназы-2 в строме ЖП при хроническом холецистите значительно выше, чем в норме [8].

При анализе современной литературы нам не встретилось исследований, посвященных уровню экспрессии ЦОГ-2 в зависимости от выраженности воспаления при хронических холециститах.

Исходя из вышеизложенного, целью нашего исследования явилось изучить уровень экспрессии циклооксигеназы-2 в зависимости от степени

выраженности воспаления в стенке желчного пузыря у больных хроническим калькулезным холециститом (ХКХ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проводили гистологическое исследование ($n = 52$) и иммуноморфологическое исследование ($n = 21$) стенки желчных пузырей, полученных во время холецистэктомии у больных ХКХ. Кроме того, была обследована контрольная группа желчных пузырей (гистологическое исследование), полученных при аутопсии умерших от заболеваний, не связанных с патологией органов пищеварения (без наличия камней и признаков воспаления в желчном пузыре) ($n = 21$).

Микроскопическое исследование стенки желчного пузыря проводилось после стандартной фиксации 10 % нейтральным формалином и подготовки микропрепарата. Окраска гистологических препаратов проводилась гематоксилином-эозином и пикрофуксином по Ван-Гизону. Для количественного морфометрического изучения объектов и их подсчета была использована система компьютерного анализа цветового изображения «ВидеоТест – Морфо 4,0». Количественные

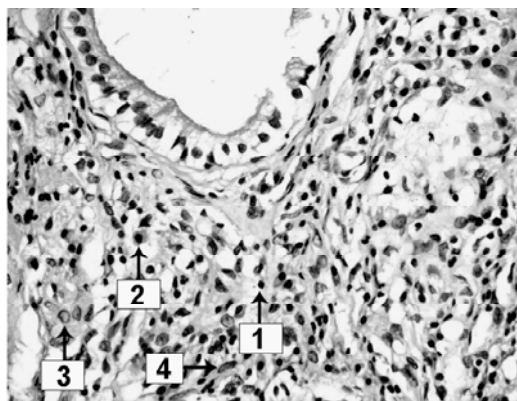


Рис. 1. Хронический воспалительный инфильтрат. Лимфоциты (1), плазматические клетки (2), макрофаги (3), фибробласты (4). Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение $\times 400$.

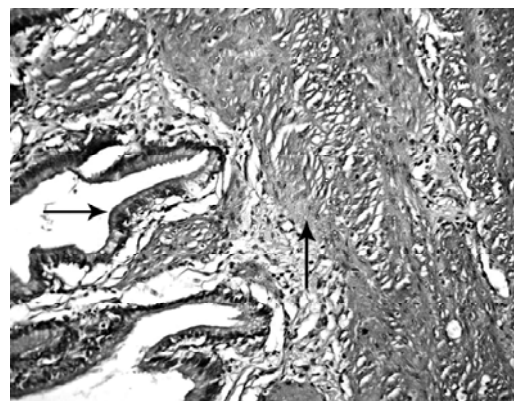


Рис. 2. Экспрессия COX-2 в эпителии слизистой и мышечном слое. РАР-метод. ДАВ. Увеличение $\times 200$.

измерения проводились в 3-х препаратах (дно, тело, шейка желчного пузыря) в 5 репрезентативных полях со стандартной измерительной рамкой при увеличении $\times 50$, 100, 200 и 400. При исследовании препаратов проводилась количественная оценка следующих параметров:

1. Количество клеточных элементов воспаления в поле зрения.
2. Лимфо-плазмацитарный индекс.
3. Среднее число нейтрофилов в поле зрения.
4. Среднее число эозинофилов в поле зрения.
5. Среднее число плазматических клеток в поле зрения.

Кроме того, полуколичественно определяли интенсивность воспалительного инфильтрата, наличие острого или хронического воспаления, метаплазии, воспаления в синусах Рокитанского-Ашоффа, наличие очаговой и диффузной лимфоцитарной инфильтрации стромы слизистой оболочки.

Иммуноморфологическое исследование проводили по протоколу DakoCytomation с первичным моноклональным антителом Cy5clooxugenase-2 (Novocastra). Экспрессию циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2) в стенке желчного пузыря оценивали полуколичественно.

Статистическую обработку проводили, используя программу Statistica 5 for Windows. Достоверность различий определяли по критерию *u*-Манна-Уитни. Изучение статистических связей между показателями выборки проводили с помощью корреляционного анализа. Направление корреляционной связи оценивали по знаку коэффициента корреляции Спирмена (r_s). Показатели считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При гистологическом исследовании стенки желчного пузыря после холецистэктомии у больных ХКХ ($n = 52$) преобладали: 1) слабо выраженные (52 % – в дне, 56 % – в шейке, 46 % – в теле) и умеренно выраженные признаки хронического воспаления (40 % – в дне, 29 % – в шейке, 56 % – в теле); 2) очаговая лимфоцитарная инфильтрация

стромы слизистой оболочки желчного пузыря (79 %); 3) диффузная лимфоцитарная инфильтрация стромы слизистой оболочки желчного пузыря (21 %); 4) умеренно выраженная атрофия слизистой оболочки ЖП (44 % – в дне, 52 % – в шейке, 48 % – в теле); 5) умеренно выраженный склероз стенки (54 % – в дне, 52 % – в шейке, 58 % – в теле); 6) умеренно выраженная гипертрофия мышечного слоя (44 % – в дне, 56 % – в шейке, 44 % – в теле); 7) метаплазия по желудочному типу (29 % – в дне, 25 % – в шейке, 29 % – в теле). Все приведенные гистологические изменения значительно различались по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Наши результаты согласуются с данными литературы [1 – 5].

Количество клеточных элементов в поле зрения: в дне – 32,0 (23,0 – 48,5) ($p < 0,05$, по отношению к контролю), в шейке – 28,0 (15,5 – 50,0) ($p < 0,05$), в теле – 33,0 (22,0 – 50,0) ($p < 0,05$) (рис. 1).

Лимфо-плазмацитарный индекс составил 9/1 ($p < 0,05$).

Повышенная экспрессия ЦОГ-2 в стенке ЖП, полученных после ХЭ от больных ХКХ ($n = 21$) была определена в 81 % в эпителиальных клетках, в 86 % – в гладкомышечных, в 57 % – в стромальных клетках, в 71 % – в стенках сосудов, в 37 % – в синусах Рокитанского-Ашоффа (рис. 2). При интенсивности воспаления в стенке ЖП слабой степени ($n = 12$) повышенная экспрессия ЦОГ-2 обнаружена в эпителии – 83 %, в гладкомышечных клетках – 75 %, в стромальных – 33 %, в стенке сосудов – 78 %, в синусах Рокитанского-Ашоффа – 17 %. В группе, включающей более выраженную степень воспаления (умеренную и резкую, $n = 9$), повышенная экспрессия ЦОГ-2 была определена в эпителиальных клетках – 78 %, в гладкомышечных – 100 %, в стромальных клетках – 78 %, в стенках сосудов – 89 %, в синусах Рокитанского-Ашоффа – 67 %. Выявлена положительная корреляция между выраженностью воспаления в стенке ЖП и выраженностью экспрессии ЦОГ-2 в гладкомышечных клетках ($r_s = +0,71$, $p < 0,001$) и стенках сосудов ($r_s = +0,51$, $p < 0,05$) (рис. 3, 4).

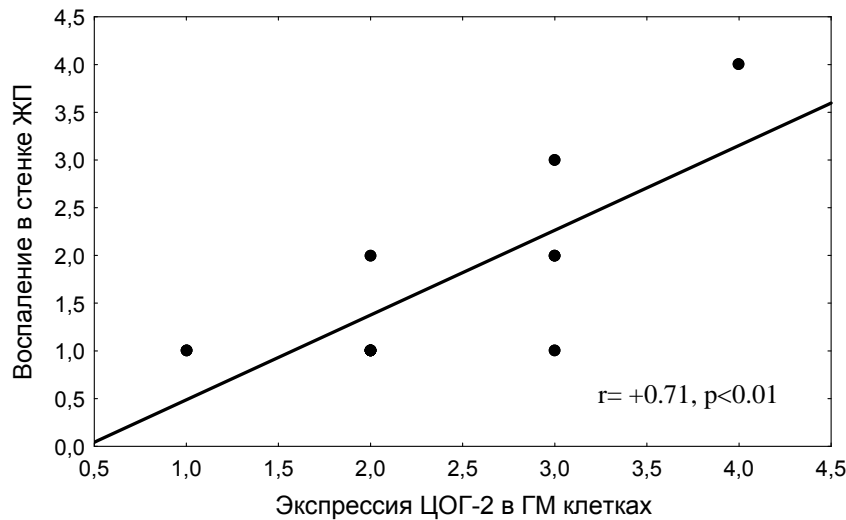


Рис. 3. Положительная взаимосвязь между выраженностью степени воспаления в стенке желчного пузыря и выраженностью экспрессии циклооксигеназы 2-го типа (ЦОГ-2) в гладкомышечных клетках (ГМ) у больных ХКХ ($n = 21$).

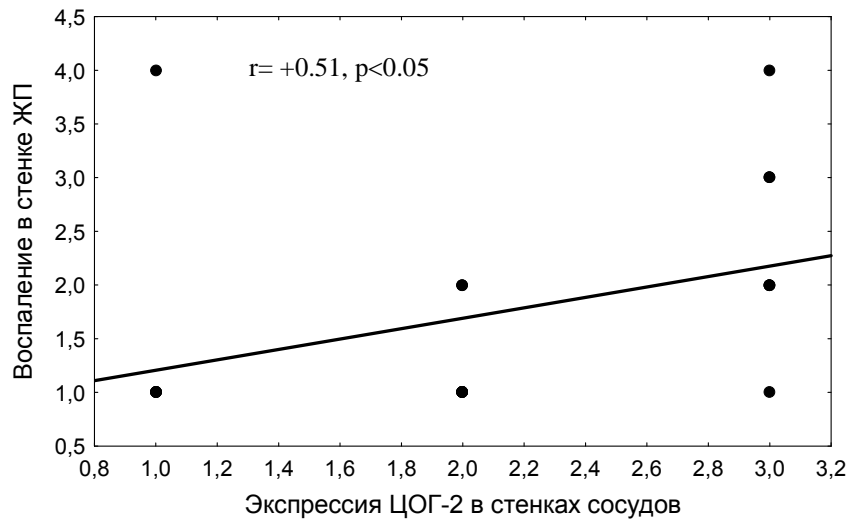


Рис. 4. Положительная взаимосвязь между выраженностью степени воспаления в стенке желчного пузыря и выраженностью экспрессии циклооксигеназы 2-го типа (ЦОГ-2) в стенках сосудов у больных ХКХ ($n = 21$).

В группе желчных пузырей, имеющих желудочную метаплазию слизистой оболочки ($n = 8$), повышенная экспрессия ЦОГ-2 была определена: в эпителиальных клетках — 100 %, в гладкомышечных — 87 %, в стромальных — 63 %, в стенках сосудов — 75 %, в синусах Рокитанского-Ашоффа — 37 %.

В этой группе обнаружена корреляция между интенсивностью воспаления и выраженностью экспрессии ЦОГ-2 в стромальных клетках ($r_s = +0,72, p < 0,05$).

При исследовании желчных пузырей без метаплазии ($n = 13$) повышенная экспрессия ЦОГ-2 обнаружена в эпителиальных клетках — 69 %, в гладкомышечных — 85 %, в стромальных — 54 %, в стенках сосудов — 69 %, в синусах Рокитанского-Ашоффа — 38 %.

Интенсивность воспаления в стенке ЖП зависела от экспрессии ЦОГ-2 в гладкомышечных клетках ($r_s = +0,82, p < 0,001$) в этой группе (рис. 5).

Повышение экспрессии ЦОГ-2 обнаружено также другими авторами в эпителиальных и стромальных клетках препаратов ЖП, полученных после ХЭ при острых и хронических холециститах, а также в гладкомышечных клетках при экспериментальном остром холецистите [8, 10, 12].

Мы не встретили указаний на повышенную экспрессию ЦОГ-2 в стенках сосудов и в синусах Рокитанского-Ашоффа.

На модели острого и хронического холециститов продемонстрировано, что увеличение освобождения простагландинов PGE_2 , 6-keto- PGF_1 -alpha в мышечных клетках, вызванное увеличением синтеза ЦОГ-2, приводит к воспалению в желчном пузыре [7] и блокируется селективными ингибиторами ЦОГ-2 [11]. В эксперименте показано, что количество рецепторов к холецистокинину уменьшается, а к PGE_2 , напротив, повышается при остром холецистите [10]. Холецистокинин подавляет освобождение PGE_2 [10].

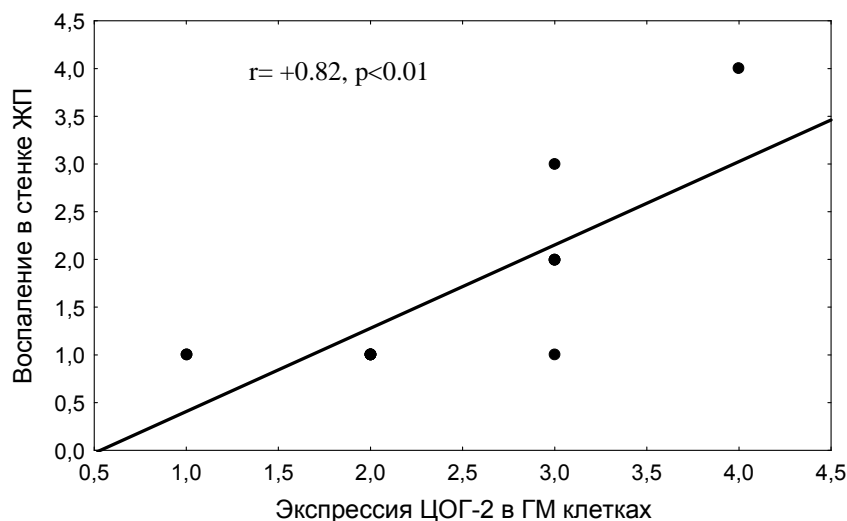


Рис. 5. Положительная взаимосвязь между выраженностью степени воспаления в стенке желчного пузыря и выраженностью экспрессии циклооксигеназы 2-го типа (ЦОГ-2) в гладкомышечных клетках (ГМ) у больных ХХХ ($n = 13$, без метаплазии).

Учитывая выше сказанное, повышение экспрессии ЦОГ-2 в эпителиальных клетках может быть причиной нарушения абсорбционной функции, в гладкомышечных клетках — снижения моторики желчного пузыря, т.е. повышенная экспрессия в указанных клетках может быть причиной хронического «мягкого» внутрипузырного холестаза. Повышенная экспрессия в гладкомышечных клетках, эпителиальных клетках и стенках сосудов может быть причиной развития хронического асептического воспаления стенки желчного пузыря.

ВЫВОДЫ

1. Повышенная экспрессия ЦОГ-2 в гладкомышечных клетках, эпителиальных клетках и стенках сосудов может быть причиной хронического асептического воспаления, хронического «мягкого» внутрипузырного холестаза и гипомоторной дисфункции желчного пузыря.

2. Избыточная экспрессия ЦОГ-2 в эпителиальных клетках может быть важным патогенетическим звеном воспалительно-метапластического процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галкин В.А. Хронический некалькулезный холецистит / В.А. Галкин. — М.: Медицина, 1986. — 128 с.
2. Ильченко А.А. Хронический бескаменный холецистит / А.А. Ильченко // *Consilium medicum*. — 2005. — Т. 7, № 6. — С. 456—459.
3. Тюрюмин Я.Л. Закономерности морфофункциональных нарушений в желчном пузыре и печени в патогенезе холестеринового холелитиаза: Дис. ... докт. мед. наук. — Иркутск, 2000. — 258 с.
4. Шапочников А.В. Холецистит. Патогенез, диагностика и хирургическое лечение / А.В. Шапочников. — РнД: Издательство Ростовского университета, 1984. — 224 с.

5. Abnormalities of gallbladder muscle associated with acute inflammation in guinea pigs / Z.-L. Xiao, Q. Chen, P. Biancani et al. // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* — 2001. — Vol. 281. — P. G490—497.

6. Bile duct ligation and oxidative stress in the rat effects in liver and kidney / M. Orellana, R. Rodrig, L. Thielemann et al. // *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* — 2000. — Vol. 126, N 2. — P. 105—111.

7. Bile duct ligation induced acute inflammation up-regulates cyclooxygenase-2 content and PGE2 release in guinea pig gallbladder smooth muscle cell cultures / S.I. Myers, L.I. Bartula, M.P. Colvin et al. // *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* — 2005. — Vol. 72, N 5. — P. 327—333.

8. Cyclooxygenase expression in the gallbladder / M. Ghosh, T. Kawamoto, N. Koike et al. // *Int. J. Mol. Med.* — 2000. — Vol. 6, N 5. — P. 527—532.

9. Cyclooxygenase-2 expression in the gallbladder of patients with anomalous arrangement of pancreatobiliary duct / S. Fumino, K. Tokiwa, S. Ono et al. // *J. Pediatr. Surg.* — 2003. — Vol. 38, N 4. — P. 585—589.

10. Cholecystokinin (CCK) down regulates PGE2 and PGI2 release in inflamed Guinea pig gallbladder smooth muscle cell cultures / S.I. Myers, L.L. Bartula, M.P. Colvin et al. // *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* — 2005. — Vol. 73, N 2. — P. 121—126.

11. Role of cyclooxygenase-2 for fluid secretion by the inflamed gallbladder mucosa / B. Nilsson, D. Delboro, L. Hedin et al. // *J. Gastrointest Surg.* — 1998. — Vol. 2, N 3. — P. 269—277.

12. Synthetic pathways of gallbladder mucosal prostanoids: the role of cyclooxygenase-1 and 2 / W.E. Longo, N. Panesar, J.E. Mazuski et al. // *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* — 1999. — Vol. 60, N 2. — P. 77—85.