

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ГЛАДКИХ МИОЦИТОВ СТЕНКИ ЖЕЛЧНОГО ПУЗЫРЯ ПРИ РАЗВИТИИ НЕКАЛЬКУЛЕЗНОГО ХОЛЕЦИСТИТА

*А.Л. Зашихин** ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6387-9719>

*Ю.В. Агафонов** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7942-9293>

*О.В. Долгих** ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2855-3160>

*Северный государственный медицинский университет
(г. Архангельск)

Цель работы – анализ ультраструктурных изменений гладкой мышечной ткани различных отделов желчного пузыря при развитии экспериментального некалькулезного холецистита. **Материалы и методы.** Работа проведена на 20 морских свинок. Длительность эксперимента составила от 4 до 15 дней. Каждая экспериментальная и контрольная группа включала 5 животных. Использовали стандартную модель хронического некалькулезного холецистита, при которой лигирование проксимального отдела общего желчного протока сопровождается воспалением и нарушением моторики желчного пузыря. **Результаты.** У морских свинок с холециститом на 15-е сутки эксперимента при помощи электронно-микроскопического исследования в гладкой мышечной ткани были выявлены клетки, сохраняющие хорошо структурированный сократительный аппарат, представленный отдельными тонкими пучками миофиламентов, и развитый синтетический аппарат. Указанная разновидность клеток более соответствует существующим представлениям об ультраструктурной организации миофибробластов. Рассматривая вопрос о трансформации гладких миоцитов стенки желчного пузыря в ходе эксперимента, необходимо учитывать, что в условиях воспаления и нарушения моторики желчного пузыря в процессе перестройки межклеточного матрикса могут появляться миофибробласты, обуславливающие развитие склеротических процессов в стенке органа благодаря своей способности экспрессировать большое количество коллагена, гликозаминогликанов, множество других молекул внеклеточного матрикса и фиброгенных цитокинов. Исследование показало, что аденомиоматозная гиперплазия стенки желчного пузыря сопровождается пролиферацией миофибробластов и гладких миоцитов. Таким образом, можно предполагать, что в основе аденомиоматозной гиперплазии желчного пузыря лежит расстройство эпителиально-стромальных взаимодействий.

Ключевые слова: мускулатура желчного пузыря, гладкие миоциты, миофибробласты, экспериментальный некалькулезный холецистит, морские свинки.

Ответственный за переписку: Долгих Ольга Васильевна, адрес: 163000, г. Архангельск, просп. Троицкий, д. 51; e-mail: olvado@mail.ru

Для цитирования: Зашихин А.Л., Агафонов Ю.В., Долгих О.В. Фенотипическая трансформация гладких миоцитов стенки желчного пузыря при развитии некалькулезного холецистита // Журн. мед.-биол. исследований. 2022. Т. 10, № 2. С. 161–166. DOI: 10.37482/2687-1491-Z102

Нарушение работы желчного пузыря является важным симптомом, отражающим моторную дисфункцию органа, которая имеет место как при остром, так и при хроническом типе холецистита. При этом данные литературы о характере ультраструктурной трансформации гладких миоцитов мышечного компонента стенки желчного пузыря при нарушении его функции ограничены [1–3]. Целью настоящего исследования явился анализ ультраструктуры гладкомышечных клеток разных отделов желчного пузыря при развитии некалькулезного холецистита.

Материалы и методы. Изучена гладкая мускулатура в составе стенки различных отделов желчного пузыря морских свинок в норме и при развитии экспериментального холецистита. Эксперимент проведен на 20 морских свинках. Образцы тканей лабораторных животных забирали на 4, 7 и 15-е сутки эксперимента. Каждая экспериментальная и контрольная группа включала по 5 особей. Для проведения исследования использовали стандартное моделирование хронического некалькулезного холецистита [4, 5], которое состоит в наложении лигатуры на проксимальный отдел желчного протока. Данная методика является общепризнанной моделью получения острого некалькулезного холецистита и сопровождается воспалением и нарушением моторики желчного пузыря [6, 7]. За 12 ч до операции животные были ограничены в еде и воде, в качестве наркоза использовался препарат «Кетамин» из расчета 20 мг/кг.

Для электронно-микроскопического исследования материал фиксировали в 2,5 %-м растворе глутарового альдегида на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,2–7,4) в течение 2 ч, с вторичной фиксацией в течение 1 ч в растворе 1 %-го тетраоксида осмия при температуре 5 °С. Образцы промывали в буфере, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации с контрастированием в 70 %-м спирте, затем 1 %-м уранилацетатом в течение 12 ч. Материал заливали в смесь эпон-аралдита.

Для прицельного электронно-микроскопического анализа использовали серийные полутонкие срезы толщиной 1–2 мкм, которые окрашивали 1 %-м раствором метиленового синего. В результате идентификации необходимых объектов блоки затачивали и прицельные ультратонкие срезы готовили на ультратоме LKB-5 (Bromma, Швеция). Контрастирование проводили в 2,5 %-м растворе уранилацетата и 0,3 %-м растворе цитрата свинца по Рейнольдсу. Визуализацию образцов осуществляли на электронных микроскопах JEM-100 CX (JEOL Ltd., Япония).

Экспериментальное исследование выполняли в соответствии с принципами биоэтики и правилами лабораторной практики, представленными в «Руководстве по содержанию и использованию лабораторных животных» (1996) [8], а также европейскими правилами и стандартами по уходу и содержанию лабораторных животных (Report of the AVMA Panel on Euthanasia (2001)). Эксперимент проводили с соблюдением принципов гуманности, изложенных в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (директива 86/609 ЕС).

Результаты. Полученные в ходе исследования данные свидетельствуют о том, что интактная гладкая мышечная ткань желчного пузыря морских свинок представлена клетками, имеющими типичную ультраструктурную характеристику гладких миоцитов (*рис. 1*).

Тем не менее при развитии холецистита, на 15-е сутки эксперимента, в гладкой мышечной ткани удается выявить клетки, в цитоплазме которых (в перинуклеарной зоне и центральной части) располагаются хорошо развитые цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума. Данные клетки сохраняют структурированный сократительный аппарат, представленный отдельными тонкими пучками миофиламентов, интегрированных с плотными тельцами и имеющих субплазмалеммальную локализацию (*рис. 2*).

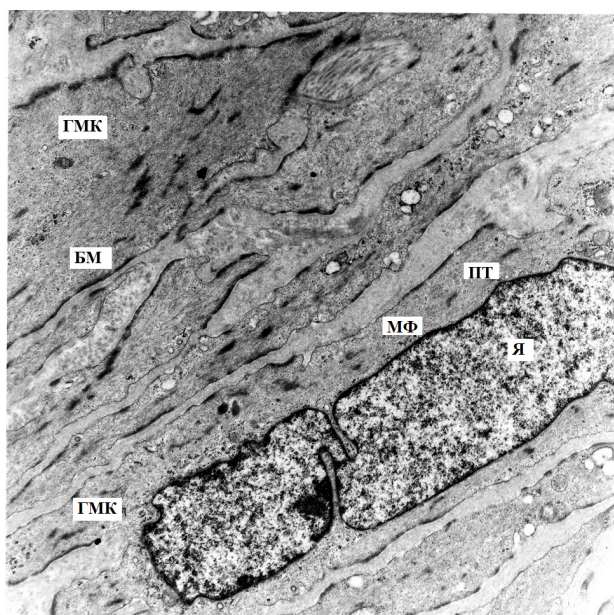


Рис. 1. Ультраструктурная организация гладких миоцитов стенки желчного пузыря морской свинки в норме: ГМК – гладкомышечные клетки; БМ – базальная мембрана; МФ – миофиламенты; ПТ – плотные тельца; Я – ядро (увеличение $\times 20\,000$)

Fig. 1. Ultrastructural organization of gallbladder smooth muscle cells in healthy guinea pigs ($\times 20\,000$ magnification)

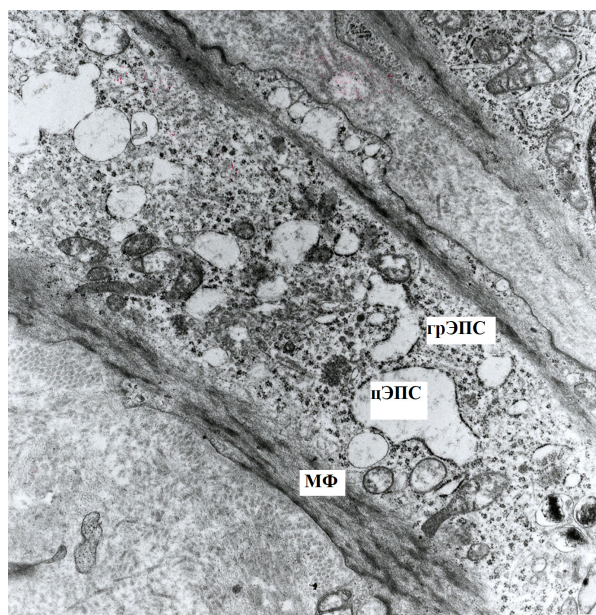


Рис. 2. Ультраструктурная организация миофибробластов стенки желчного пузыря морской свинки с хроническим некалькулезным холециститом на 15-е сутки эксперимента: грЭПС – гранулярная эндоплазматическая сеть; цЭПС – расширенные цистерны эндоплазматической сети; МФ – миофиламенты; (увеличение $\times 20\,000$)

Fig. 2. Ultrastructural organization of myofibroblasts in the gallbladder wall of a guinea pig with chronic acalculous cholecystitis on day 15 of the experiment ($\times 20\,000$ magnification)

Выявленная разновидность клеток более соответствует существующим представлениям об ультраструктурной организации миофибробластов [9, с. 14]. До настоящего времени вопрос о дефинициях миофибробластов остается открытым, в т. ч. из-за их гетерогенности [10, 11]. При этом наличие развитого синтетического аппарата наряду с хорошо структурированными сократительными элементами позволяет рассматривать данные клетки как клетки миофибробластического типа [9].

Обсуждение. Рассматривая вопрос о трансформации гладких миоцитов стенки желчного пузыря в ходе эксперимента, необходимо учитывать, что в условиях воспаления и нарушения моторики желчного пузыря в процессе перестройки межклеточного матрикса могут появляться миофибробласты [12]. В ходе на-

стоящего исследования показано, что аденомиоматозная гиперплазия стенки желчного пузыря сопровождается пролиферацией миофибробластов и гладкомышечных клеток. Это позволяет предполагать расстройство эпителиально-стромальных взаимодействий в качестве основы патологии при аденомиоматозной гиперплазии желчного пузыря [3].

Перевязка общего желчного протока ведет к нарушению сократительной функции гладкомышечной ткани желчного пузыря [4] и вызывает растяжение его стенки. Вместе с тем известно, что механический стресс стимулирует миофибробластическую трансформацию [11–13].

Миофибробласты представляют собой интересный и спорный тип мезенхимальных клеток. Интересный, поскольку их черты при-

сутствуют в других клеточных типах: в фибробластах и гладких миоцитах. А спорный, поскольку миофибробласты очень гетерогенны и их трудно идентифицировать [3, 9–12]. В качестве источников миофибробластов рассматриваются как стволовые клетки костного мозга, так и фиброциты [14], а также фибробласты, гладкомышечные клетки, перициты, эпителиальные клетки (эпителиально-мезенхимальный переход), эндотелиальные клетки и перисинусоидные клетки печени [15–17].

Таким образом, в процессе реактивной трансформации стенки желчного пузыря при развитии некалькулезного холецистита могут быть задействованы механизмы миофибробластической трансформации клеток-пред-

шественников. Это обуславливает развитие склеротических процессов в стенке органа благодаря способности миофибробластов экспрессировать большое количество коллагена, гликозаминогликанов, множество других молекул внеклеточного матрикса и фиброгенных цитокинов [3, 9, 10, 12]. Вопрос о гистогенезе и функциональной роли синтетических гладких миоцитов и миофибробластов в реактивной трансформации гладкой мускулатуры является одной из актуальных тем современной гистопатологии и требует дальнейшего анализа [10], в частности при патологии желчного пузыря.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Horton J.D., Bilhartz L.E. Gallstone Disease and Its Complications // *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology/Diagnosis/Management* / ed. by M. Feldman, L.S. Friedman, M.H. Sleisenger. Philadelphia: Saunders, 2002. P. 1065–1090.
2. 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 // *J. Surg. Res.* 2000. Vol. 88, № 2. P. 186–192. DOI: [10.1006/jsre.1999.5788](https://doi.org/10.1006/jsre.1999.5788)
3. Krishnamurthy K., Febres-Aldana C.A., Melnick S., Sriganeshan V., Poppiti R.J. Morphological and Immunophenotypical Analysis of the Spindle Cell Component in Adenomyomatous Hyperplasia of the Gallbladder // *Pathologica*. 2021. Vol. 113, № 4. P. 272–279. DOI: [10.32074/1591-951X-155](https://doi.org/10.32074/1591-951X-155)
4. Myers S., Evans C.T., Bartula L., Kalley-Taylor B., Habeeb A.R., Goka T. Increased Gall-Bladder Prostanoid Synthesis After Bile-Duct Ligation in the Rabbit Is Secondary to New Enzyme Formation // *Biochem. J.* 1992. Vol. 288, pt. 2. P. 585–590. DOI: [10.1042/bj2880585](https://doi.org/10.1042/bj2880585)
5. Ryan J.P. Motility of the Biliary Tree // *Textbook of Gastroenterology* / ed. by T. Yamada. Philadelphia: JB Lippincott, 1991. P. 92–112.
6. 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. Vol. 281, № 2. P. G490–G497. DOI: [10.1152/ajpgi.2001.281.2.G490](https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.281.2.G490)
7. 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.* 1999. Vol. 44, № 11. P. 2235–2243. DOI: [10.1023/a:1026600603121](https://doi.org/10.1023/a:1026600603121)
8. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington: National Academy Press, 1996. P. 96–98.
9. Rao S., Jagadish Rao P.P., Jyothi B.M., Varsha V.K. Mysterious Myofibroblast: A Cell with Diverse Origin and Multiple Function // *J. Interdiscipl. Histopathol.* 2017. Vol. 5, № 1. P. 12–17.
10. Shook B.A., Wasko R.R., Rivera-Gonzalez G.C., Salazar-Gatzimas E., López-Giráldez F., Dash B.C., Muñoz-Rojas A.R., Aultman K.D., Zwick R.K., Lei V., Arbiser J.L., Miller-Jensen K., Clark D.A., Hsia H.C., Horsley V. Myofibroblast Proliferation and Heterogeneity Is Supported by Macrophages During Skin Repair // *Science*. 2018. Vol. 362, № 6417. Art. № eaar2971. DOI: [10.1126/science.aar2971](https://doi.org/10.1126/science.aar2971)
11. D'Urso M., Kurniawan N.A. Mechanical and Physical Regulation of Fibroblast–Myofibroblast Transition: From Cellular Mechanoreponse to Tissue Pathology // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020. № 8. Art. № 609653. DOI: [10.3389/fbioe.2020.609653](https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.609653)

12. Duong T.E., Hagood J.S. Epigenetic Regulation of Myofibroblast Phenotypes in Fibrosis // *Curr. Pathobiol. Rep.* 2018. Vol. 6, № 1. P. 79–96.
13. Hinz B., Gabbiani G. Mechanisms of Force Generation and Transmission by Myofibroblasts // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2003. Vol. 14, № 5. P. 538–546. DOI: [10.1016/j.copbio.2003.08.006](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2003.08.006)
14. Roife D., Fleming J.B., Gomer R.H. Fibrocytes in the Tumor Microenvironment // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2020. Vol. 1224. P. 79–85. DOI: [10.1007/978-3-030-35723-8_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-35723-8_6)
15. Bagalad B.S., Mohan Kumar K.P., Puneeth H.K. Myofibroblasts: Master of Disguise // *J. Oral Maxillofac. Pathol.* 2017. Vol. 21, № 3. P. 462–463. DOI: [10.4103/jomfp.JOMFP_146_15](https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_146_15)
16. Yuan Q., Tan R.J., Liu Y. Myofibroblast in Kidney Fibrosis: Origin, Activation, and Regulation // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019. Vol. 1165. P. 253–283. DOI: [10.1007/978-981-13-8871-2_12](https://doi.org/10.1007/978-981-13-8871-2_12)
17. Salton F., Volpe M.C., Confalonieri M. Epithelial–Mesenchymal Transition in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis // *Medicina (Kaunas)*. 2019. Vol. 55, № 4. Art. № 83. DOI: [10.3390/medicina55040083](https://doi.org/10.3390/medicina55040083)

References

1. Horton J.D., Bilhartz L.E. Gallstone Disease and Its Complications. Feldman M., Friedman L.S., Sleisenger M.H. (eds.). *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology/Diagnosis/Management*. Philadelphia, 2002, pp. 1065–1090.
2. 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. *J. Surg. Res.*, 2000, vol. 88, no. 2, pp. 186–192. DOI: [10.1006/jsre.1999.5788](https://doi.org/10.1006/jsre.1999.5788)
3. Krishnamurthy K., Febres-Aldana C.A., Melnick S., Sriganeshan V., Poppiti R.J. Morphological and Immunophenotypical Analysis of the Spindle Cell Component in Adenomyomatous Hyperplasia of the Gallbladder. *Pathologica*, 2021, vol. 113, no. 4, pp. 272–279. DOI: [10.32074/1591-951X-155](https://doi.org/10.32074/1591-951X-155)
4. Myers S., Evans C.T., Bartula L., Kalley-Taylor B., Habeeb A.R., Goka T. Increased Gall-Bladder Prostanoid Synthesis After Bile-Duct Ligation in the Rabbit Is Secondary to New Enzyme Formation. *Biochem. J.*, 1992, vol. 288, pt. 2, pp. 585–590. DOI: [10.1042/bj2880585](https://doi.org/10.1042/bj2880585)
5. Ryan J.P. Motility of the Biliary Tree. Yamada T. (ed.). *Textbook of Gastroenterology*. Philadelphia, 1991, pp. 92–112.
6. 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, vol. 281, no. 2, pp. G490–G497. DOI: [10.1152/ajpgi.2001.281.2.G490](https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.281.2.G490)
7. 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.*, 1999, vol. 44, no. 11, pp. 2235–2243. DOI: [10.1023/a:1026600603121](https://doi.org/10.1023/a:1026600603121)
8. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington, 1996, pp. 96–98.
9. Rao S., Jagadish Rao P.P., Jyothi B.M., Varsha V.K. Mysterious Myofibroblast: A Cell with Diverse Origin and Multiple Function. *J. Interdiscipl. Histopathol.*, 2017, vol. 5, no. 1, pp. 12–17.
10. Shook B.A., Wasko R.R., Rivera-Gonzalez G.C., Salazar-Gatzimas E., López-Giráldez F., Dash B.C., Muñoz-Rojas A.R., Aultman K.D., Zwick R.K., Lei V., Arbiser J.L., Miller-Jensen K., Clark D.A., Hsia H.C., Horsley V. Myofibroblast Proliferation and Heterogeneity Is Supported by Macrophages During Skin Repair. *Science*, 2018, vol. 362, no. 6417. Art. no. eaar2971. DOI: [10.1126/science.aar2971](https://doi.org/10.1126/science.aar2971)
11. D'Urso M., Kurniawan N.A. Mechanical and Physical Regulation of Fibroblast–Myofibroblast Transition: From Cellular Mechanoreponse to Tissue Pathology. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2020, no. 8. Art. no. 609653. DOI: [10.3389/fbioe.2020.609653](https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.609653)
12. Duong T.E., Hagood J.S. Epigenetic Regulation of Myofibroblast Phenotypes in Fibrosis. *Curr. Pathobiol. Rep.*, 2018, vol. 6, no. 1, pp. 79–96. DOI: [10.1007/s40139-018-0155-0](https://doi.org/10.1007/s40139-018-0155-0)
13. Hinz B., Gabbiani G. Mechanisms of Force Generation and Transmission by Myofibroblasts. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2003, vol. 14, no. 5, pp. 538–546. DOI: [10.1016/j.copbio.2003.08.006](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2003.08.006)
14. Roife D., Fleming J.B., Gomer R.H. Fibrocytes in the Tumor Microenvironment. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2020, vol. 1224, pp. 79–85. DOI: [10.1007/978-3-030-35723-8_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-35723-8_6)
15. Bagalad B.S., Mohan Kumar K.P., Puneeth H.K. Myofibroblasts: Master of Disguise. *J. Oral Maxillofac. Pathol.*, 2017, vol. 21, no. 3, pp. 462–463. DOI: [10.4103/jomfp.JOMFP_146_15](https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_146_15)

16. Yuan Q., Tan R.J., Liu Y. Myofibroblast in Kidney Fibrosis: Origin, Activation, and Regulation. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2019, vol. 1165, pp. 253–283. DOI: [10.1007/978-981-13-8871-2_12](https://doi.org/10.1007/978-981-13-8871-2_12)

17. Salton F., Volpe M.C., Confalonieri M. Epithelial–Mesenchymal Transition in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Medicina (Kaunas)*, 2019, vol. 55, no. 4. Art. no. 83. DOI: [10.3390/medicina55040083](https://doi.org/10.3390/medicina55040083)

DOI: 10.37482/2687-1491-Z102

*Andrey L. Zashikhin** ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6387-9719>

*Yuriy V. Agafonov** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7942-9293>

*Ol'ga V. Dolgikh** ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2855-3160>

*Northern State Medical University
(Arkhangelsk, Russian Federation)

PHENOTYPIC MODULATION OF GALLBLADDER SMOOTH MUSCLE CELLS DURING THE DEVELOPMENT OF ACALCULOUS CHOLECYSTITIS

The **aim** of the study was to analyse ultrastructural changes in the smooth muscle tissue of different gallbladder sections during the development of experimental acalculous cholecystitis. **Materials and methods.** The research was performed on 20 guinea pigs. The duration of the experiment ranged from 4 to 15 days. Each experimental and control group included 5 animals. A standard model of chronic acalculous cholecystitis was used, in which ligation of the proximal part of the common bile duct is accompanied by inflammation and impaired gallbladder motility. **Results.** In guinea pigs with cholecystitis, on day 15 of the experiment using electron microscopic examination we revealed cells in the smooth muscle tissue that retain a well-structured contractile apparatus, represented by separate thin bundles of myofilaments, and a developed synthetic apparatus. The ultrastructural organization of this type of cells is quite characteristic of myofibroblasts. Studying the modulation of gallbladder smooth muscle cells in an experiment, we need to take into account that in the conditions of inflammation and impaired gallbladder motility, during the restructuring of the intercellular matrix, myofibroblasts can appear, causing the development of sclerotic processes in the organ wall due to their ability to express high levels of collagen and glycosaminoglycans, as well as numerous other extracellular matrix molecules and fibrogenic cytokines. The research showed that adenomyomatous hyperplasia of the gallbladder wall is accompanied by proliferation of myofibroblasts and smooth muscle cells. Thus, impaired stromal-epithelial interactions can be assumed to underlie the pathology in adenomyomatous hyperplasia of the gallbladder.

Keywords: *gallbladder musculature, smooth muscle cells, myofibroblasts, experimental acalculous cholecystitis, guinea pigs.*

Поступила 13.02.2022

Принята 15.04.2022

Received 13 February 2022

Accepted 15 April 2022

Corresponding author: Ol'ga Dolgikh, address: prosp. Troitskiy 51, Arkhangelsk, 163000, Russian Federation; e-mail: olvado@mail.ru

For citation: Zashikhin A.L., Agafonov Yu.V., Dolgikh O.V. Phenotypic Modulation of Gallbladder Smooth Muscle Cells During the Development of Acalculous Cholecystitis. *Journal of Medical and Biological Research*, 2022, vol. 10, no. 2, pp. 161–166. DOI: 10.37482/2687-1491-Z102