

ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА В НОВООБРАЗОВАНИЯХ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ТОЛСТОЙ КИШКИ ПОСЛЕ ХОЛЕЦИСТЭКТОМИИ *

Галицкий М. В.¹, Хомерики С. Г.², Никифоров П. А.³

¹ ФГУ Центральный Клинический военный госпиталь ФСБ России,

² ГУ Центральный научно-исследовательский институт гастроэнтерологии ДЗ г. Москва,

³ МЦ УД Президента РФ, Москва

Галицкий Михаил Владимирович
123182 Москва, ул. Щукинская, д.20
Тел.: 8 (495) 196-5367
E-mail: galizkym@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Удаление желчного пузыря приводит к изменению темпа поступления желчи в кишечник, что ведет к повышению скорости пролиферации толстокишечного эпителия и служит фактором риска для развития опухолей. При этом особенности клеточной кинетики опухолей толстой кишки (ТК), развивающихся у больных с холецистэктомией, изучены мало.

Цель. Изучить иммуногистохимические маркеры пролиферации и апоптоза в клетках аденом и аденокарцином ТК у больных, перенесших холецистэктомию.

Материал и методы. Полипэктомия была проведена у 40 больных с сохраненной функцией желчного пузыря и у 10 больных с перенесенной ранее операцией холецистэктомии. Всего было исследовано 83 опухоли и 49 биоптатов слизистой оболочки. Иммуногистохимически выявляли маркер апоптоза — p-53 и маркер пролиферации клеток — Ki-67.

Результаты. Индекс метки Ki-67 у больных с холецистэктомией составил в слизистой оболочке ТК $37,5 \pm 1,8\%$ ($p < 0,05$). В аденомах и аденокарциномах $43,4 \pm 3,45$ и $64,33 \pm 7,67\%$ соответственно ($p < 0,01$). Белок p53 в неизменной слизистой у больных с холецистэктомией экспрессируется с такой же частотой, как и у больных без холецистэктомии (у 37%). У последних частота выявления апоптоза в ткани аденом не изменяется, однако в ткани аденокарцином апоптозы не выявлены ни в одном случае. В отличие от этого у больных с холецистэктомией частота выявления апоптоза в ткани аденом существенно увеличивается (до 80%), а в ткани аденокарцином апоптозы выявлены в 30,8%.

Заключение. Удаление желчного пузыря приводит к увеличению пролиферативной активности клеток эпителия ТК с повышением вероятности развития опухолей. Однако при развитии новообразований ТК у больных, перенесших холецистэктомию, наблюдается выраженное усиление апоптозной активности в ткани опухолей, что является благоприятным прогностическим признаком течения опухолевой патологии в этой группе больных.

Ключевые слова: холецистэктомия; толстая кишка; опухоли; иммуногистохимия; пролиферация; апоптоз.

* иллюстрации к статье — на цветной вклейке в журнал.



SUMMARY

The cholecystectomy results in change of cholic acids flow into intestine. Permanent type of the bile flow provokes the increase of proliferation of colic epithelial cells and increases the risk for development of right-sided colorectal tumors. Meanwhile morphological features of colorectal tumors at the patients with cholecystectomy are still remaining to be clarified. The goal of the study was to investigate immunohistochemical markers of proliferation and apoptosis in colorectal adenomas and adenocarcinomas at the patients with cholecystectomy.

Fifty patients (40 with retained function of gallbladder and 10 patients with cholecystectomy) histologically diagnosed as proximal colon adenoma or adenocarcinoma were included into the study. Colonoscopic biopsies have been taken from the lesion in cancer patients, and colonoscopic polypectomy has been performed for adenomas. In addition, biopsies have been taken from the adjacent healthy colon mucosa at least 5 cm from the lesion in each patient. 83 tumors and 49 samples of mucosa were immunostained with monoclonal mouse anti-human p53 protein (Dako) and monoclonal mouse anti-human Ki-67 antigen (Novocastra). The index of Ki-67 expression in healthy colon mucosa at the patients with cholecystectomy was $37,5 \pm 1,8\%$ ($p < 0,05$) as compared to $31,36 \pm 1,9$ at the patients without cholecystectomy. No significant difference was detected in the comparison of Ki-67 expression levels between the healthy mucosa and adenomas at the patients with cholecystectomy $43,4 \pm 3,45$ ($p > 0,05$), but more prominent increase was revealed in adenocarcinomas $64,33 \pm 7,67\%$ ($p < 0,01$). Protein p53 expression in healthy mucosa at the patients with a cholecystectomy was at the same level as at the patients without cholecystectomy (37%). At the patients without cholecystectomy the frequency of revealing p53 in adenomas does not vary, compared with healthy mucosa, however in adenocarcinomas p53 was not revealed at none case. As a contrast, in group of the patients with cholecystectomy the frequency of revealing p53 in adenomas is considerably increased (up to 80%), and even in adenocarcinomas, p53 was revealed in 30,8% of cases.

Thus, in benign colorectal tumors at the patients with retained function of gallbladder intensifying of epithelial cells proliferation is not accompanied with intensifying of apoptosis, and in malignant tumors a complete suppression of apoptosis is observed.

At the patients with a cholecystectomy, the increase of proliferative activity is accompanied by increased apoptosis in adenomas and maintained apoptosis in adenocarcinomas. The retaining of apoptosis in colorectal tumors compensates intensive proliferative activity with expectation of better prognosis.

Keywords: cholecystectomy, large intestine, tumor, immunohistochemistry, proliferation, apoptosis.

ВВЕДЕНИЕ

Удаление желчного пузыря существенно влияет на морфологические характеристики слизистой оболочки толстой кишки. Гистологическое изучение участков макроскопически неизменной слизистой оболочки толстой кишки и данные морфометрического анализа свидетельствуют о развитии процессов ее атрофии. При этом наблюдается истончение слизистой оболочки ($377,21 \pm 16,9$ мкм) и уменьшение глубины крипт ($299,9 \pm 14,1$ мкм) по сравнению с больными с сохраненной функцией желчного пузыря. Выраженная атрофия слизистой оболочки толстой кишки сопровождается дистрофическими изменениями эпителиальных клеток, образованием эрозий на поверхности, воспалительной инфильтрацией стромы, увеличением количества межэпителиальных лимфоцитов [1].

Перестройка процессов желчевыделения, происходящая после удаления желчного пузыря, сопровождается изменением темпа поступления желчи в кишечник. Непрерывное, медленное поступление желчных кислот в просвет кишки приводит к нарушению процесса их деконъюгации и, следовательно, к изменению энтерогепатической циркуляции пула желчных кислот [2–4]. Это способствует вовлечению желчных кислот в различные патологические процессы, ведущие к секреторной диарее, нарушениям местной иммунной системы, канцерогенезу толстой кишки [5; 6]. Под влиянием желчных кислот на эпителиальные клетки толстой кишки происходит увеличение проницаемости слизистой оболочки, усиление десквамации клеток эпителия и увеличение их пролиферативной активности. Давно обсуждается связь холецистэктомии и рака толстой кишки на основе предположения о канцерогенном действии желчных кислот на слизистую



оболочку кишки [7; 8]. Повышение концентрации желчных кислот в слизистой оболочке толстой кишки обнаружено при экспериментальной карциноме, вызванной азоксиметаном у крыс [9]. Установлена также прямая корреляционная зависимость между концентрацией желчных кислот в кале и развитием колоректальных карцином [10]. Наряду с этим установлено повышение скорости пролиферации толстокишечного эпителия под влиянием желчных кислот, что имеет большое значение в механизме канцерогенеза толстой кишки [11–13].

Однако в противоположность этим данным изучение аутопсийного материала не выявило четкой взаимосвязи между холецистэктомией и последующим развитием карциномы в толстой кишке [14]. При обследовании больных, которым проводили длительную терапию желчнокаменной болезни холелитолитическими препаратами, не было обнаружено изменения пролиферативной активности клеток эпителия толстой кишки [15].

На изучение пролиферативной активности клеток эпителия толстой кишки и клеток доброкачественных и злокачественных эпителиальных опухолей толстой кишки возлагались большие надежды как на объективный маркер для оценки особенностей клинического течения опухолевой патологии или потенциального риска развития рака. Однако в большинстве работ не установлено достоверной корреляционной связи между пролиферативной активностью и различными клиническими параметрами, включая пол, возраст, степень злокачественности и тип роста опухоли, наличие метастазов [16; 17]. Есть данные, что пролиферативная активность клеток слизистой оболочки толстой кишки на различном удалении от опухоли не различается [18], и это не позволяет использовать определение пролиферативной активности для оценки риска развития рака. Хотя показатели индекса пролиферативной активности для нормальной слизистой варьируют от 14 до 26%, для аденом — от 25 до 34%, а для аденокарцином — от 38 до 78% по данным различных авторов, но большинство исследователей сходятся во мнении о нарастании пролиферативной активности эпителия толстой кишки в ряду нормальная слизистая — аденома — аденокарцинома.

Противоречивые сведения о возможности взаимосвязи холецистэктомии и рака толстой кишки и различные данные, касающиеся воздействия желчных кислот на слизистую оболочку толстой кишки, а также высокая актуальность изучения механизмов канцерогенеза толстой кишки побудили нас провести собственное исследование. Целью нашего исследования явилось сравнительное изучение иммуногистохимических маркеров пролиферации и апоптоза в клетках полипозных образований толстой кишки в группах больных, перенесших холецистэктомию, и у больных с сохраненной функцией желчного пузыря.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для исследования служили полипозные образования толстой кишки, удаленные при операции полипэктомии, а также участки неизменной слизистой оболочки толстой кишки на расстоянии 5–10 см от полипозных образований. Из 50 прооперированных больных у 10 ранее была перенесена операция холецистэктомии. Возраст больных — от 50 до 75 лет. Всего было удалено и исследовано 83 полипозных образования и 49 участков неизменной слизистой оболочки. Биоптаты небольшого размера (до 1,5 см) брали для гистологического исследования целиком. Материал фиксировали в 10%-ном растворе формалина, забуференном по Лилли, затем заливали в парафин по обычной методике. Для обзорных целей срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическое исследование проводили пероксидазно-антипероксидазным методом по стандартному протоколу с применением панели моноклональных антител p-53 RTU (DAKO, Дания) и Ki-67 в разведении 1:75 (Novocastra, Великобритания).

Для антител к белку p53 использовался метод восстановления антигенной специфичности путем микроволновой обработки стекол, помещенных в раствор *BD Antigen Retrieval*, при мощности 750 Вт в режиме 2 раза по 10 минут. Использовался негативный контроль с тканью без нанесения первичных антител. Срез считался иммуноположительным на белок p53, если специфическое окрашивание выявлялось более чем в 1% эпителиальных клеток. Для каждой группы учитывалось процентное содержание иммуноположительных препаратов.

Изучение пролиферативной активности проводилось по той же методике, но с предварительной обработкой срезов в режиме автоклавирувания. Далее наносились первичные антитела и инкубировались в течение 30 минут при комнатной температуре. На следующем этапе применялась система *EnVision* (DAKO, Дания). В качестве систем визуализации использовали DAB фирмы DAKO. Интенсивность пероксидазной метки оценивали количественным методом — по числу позитивных на 100 клеток (при учете 200–500 эпителиальных клеток).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При гистологическом исследовании полипозных образований толстой кишки у 40 больных с сохраненной функцией желчного пузыря было верифицировано 23 тубулярные аденомы, 13 тубулярно-ворсинчатых аденом и 19 аденокарцином. В группе из 10 больных, перенесших холецистэктомию, полипозные образования чаще носили множественный характер. В этой группе гистологически было

Таблица 1

ИНДЕКСЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ (%) ПО ЭКСПРЕССИИ АНТИГЕНА KI-67 (М ± м)			
	Неизменная слизистая оболочка	Аденомы	Аденокарциномы
Больные с сохраненной функцией желчного пузыря	31,36 ± 1,9 n = 33	41,85 ± 3,05 n = 36 p < 0,001**	39,67 ± 5,25 n = 19 p < 0,05**
Больные, перенесшие холецистэктомию	37,5 ± 1,8 n = 16 p < 0,05*	43,4 ± 3,45 n = 15 н/д*, н/д**	64,33 ± 7,67 n = 13 p < 0,01*, p < 0,001**

* — сравнение с группой больных с сохраненной функцией желчного пузыря.

** — сравнение с неизменной слизистой оболочкой.

верифицировано 15 тубулярных аденом и 13 аденокарцином.

Статистически достоверное увеличение экспрессии маркера пролиферации Ki-67 в эпителии неизменной слизистой оболочки толстой кишки у больных, перенесших холецистэктомию по поводу желчнокаменной болезни, свидетельствует об увеличении пролиферативной активности эпителиальных клеток (табл. 1). Изменяется и зона расположения пролиферативного компартмента по оси крипты. Если в участках макроскопически неизменной слизистой оболочки у больных с сохраненной функцией желчного пузыря пролиферирующие клетки располагаются преимущественно ближе к базальным отделам, то у больных с холецистэктомией зона пролиферативного компартмента смещается в направлении просвета кишки и даже может располагаться рядом с поверхностным эпителием (рис. 1). Такие же изменения в локализации зоны преобладающей пролиферативной активности по оси крипты были отмечены другими авторами у больных с наследственным семейным полипозом толстой кишки [19].

Наши данные согласуются с исследованиями некоторых авторов [1; 8; 12; 13], которые также обнаруживали повышение пролиферативной активности клеток эпителия толстой кишки у больных после удаления желчного пузыря и высказывали

предположение о возможности увеличения у них риска развития неопластического процесса в толстой кишке.

Полученные нами более высокие по сравнению с другими авторами цифры индекса включения метки Ki-67 в неизменной слизистой оболочке могут быть обусловлены тем, что в ряде работ для иммуногистохимической реакции использовались замороженные срезы, в которых хуже сохраняются антигенные свойства белковых молекул. Кроме того, в некоторых работах пролиферативная активность нормальной слизистой оболочки оценивалась у больных без полипозных образований толстой кишки [16].

Так же как и другие авторы, мы отметили увеличение индекса включения метки Ki-67 в аденомах и аденокарциномах толстой кишки. Однако в отличие от других исследователей в группе больных с сохраненной функцией желчного пузыря мы не обнаружили достоверных различий между индексами включения метки в аденомах и аденокарциномах. В то же время в группе больных с холецистэктомией эти различия были налицо. Вызывает удивление, что в аденомах толстой кишки у больных с холецистэктомией индекс включения метки Ki-67 хотя и увеличивался по сравнению с неизменной слизистой оболочкой, но увеличение это не было статистически достоверным.

Таблица 2

ЧАСТОТА ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРА АПОПТОЗА P53 В БИОПТАТАХ ИЗ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ И НОВООБРАЗОВАНИЙ ТОЛСТОЙ КИШКИ			
	Неизменная слизистая оболочка	Аденомы	Аденокарциномы
Больные с сохраненной функцией желчного пузыря	36,4% 12 n = 33	38,9% 14 n = 36	0 0 n = 19
Больные, перенесшие холецистэктомию	37,5% 6 n = 16	80,0% 12 n = 15	30,8% 4 n = 13

Маркер апоптоза p53 в эпителии неизменной слизистой оболочки толстой кишки у больных с холецистэктомией экспрессируется с такой же частотой, как и у больных с сохранной функцией желчного пузыря (табл. 2). В группе больных с сохраненной функцией желчного пузыря частота выявления апоптоза в ткани аденом практически не изменяется, однако в ткани аденокарцином апоптозы не удалось выявить ни в одном случае. В отличие от этого в группе больных с холецистэктомией частота выявления апоптоза в ткани аденом существенно увеличивается и даже в ткани аденокарцином апоптозы выявлены в 30,8% случаев (рис. 2).

Как показали результаты проведенного нами исследования, при развитии неопластического процесса в слизистой оболочке толстой кишки у больных с сохраненной функцией желчного пузыря на фоне усиления пролиферативной активности эпителиальных клеток не наблюдается усиления активности апоптоза, а злокачественный процесс сопровождается полным подавлением апоптозной активности клеток.

При развитии неопластического процесса в слизистой оболочке толстой кишки у больных с удаленным желчным пузырем усиление пролиферативной активности эпителиальных клеток сопровождается усилением апоптоза в клетках доброкачественных

опухолей и сохранением апоптозной активности в клетках аденокарцином. Как известно, экспрессия маркера апоптоза p53 в ткани злокачественной опухоли является благоприятным прогностическим признаком [20]. Сохранение механизма апоптоза в новообразованиях толстой кишки у больных, перенесших холецистэктомию, компенсирует более выраженное усиление пролиферативной активности и позволяет рассчитывать на сравнительно благоприятное течение заболевания и лучший прогноз. Это объясняет, видимо, и противоречивые данные, имеющиеся в научной литературе, относительно роли холецистэктомии в развитии опухолей толстой кишки.

Таким образом, удаление желчного пузыря приводит к нарушению процесса клеточного обновления с повышением вероятности развития доброкачественных и злокачественных новообразований. Однако при развитии аденом толстой кишки у больных, перенесших холецистэктомию, на фоне повышения пролиферации клеток наблюдается выраженное усиление апоптозной активности в ткани опухоли, а при развитии аденокарциномы более трети опухолей экспрессируют маркеры апоптоза, что является благоприятным прогностическим признаком естественного течения опухолевой патологии в этой группе больных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хомерики Н.М. Функционально-морфологические взаимосвязи в слизистой оболочке толстой кишки у больных после резекции желудка и холецистэктомии: автореф. дис. канд. мед. наук. — 1992. — 23 с.
2. Ильченко А.А. Заболевания желчного пузыря и желчных путей: Руководство для врачей. — М.: Анахарсис, 2006. — 448 с.
3. Almond H. R., Vlahcevic Z., Bell C. et al. Bile acids pools kinetics and biliary lipid composition before and after cholecystectomy//N. Engl. J. Med. — 1973. — Vol. 289. — P. 1213–1216.
4. Mekhjian H. S., Phillips S. F., Hofmann A. F. Colonic absorption of unconjugated bile acids. Perfusion studies in man//Dig. Dis. Sci. — 1979. — Vol. 24, № 7. — P. 545–550.
5. Berkel J., Hombergen M. A., Hooyman I. E. Cholecystectomy and colon cancer//Am. J. Gastroenterol. — 1990. — Vol. 85, № 1. — P. 61–64.
6. Zimmer A., Gespach C. Bile acids and derivatives, their nuclear receptors FXR, PXR and ligands: role in health and disease and their therapeutic potential//Anticancer Agents Med. Chem. — 2008. — Vol. 8, № 5. — P. 540–563.
7. Brewer N. F., Katschinski B., Mortl E. et al. Large bowel cancer risk in cholelithiasis and after cholecystectomy. Postmortem study//Digestion. — 1988. — Vol. 40, № 4. — P. 219–226.
8. Friedman L. D. Cancer of the large bowel after cholecystectomy//Biomed. Pharmacother. — 1988. — Vol. 42, № 6. — P. 369–372.
9. Nigro N. D., Sardesai V. M., Chomchai M. Bile acid content of intestinal tissue and feces during azoxymethane carcinogenesis in the rat//Fed. Proc. — 1974. — Vol. 33. — P. 200.
10. Mower H. F., Ray R. M., Shoff R. et al. Fecal bile acids in two Japanese populations with different colon cancer risks//Cancer Res. — 1979. — Vol. 39. — P. 328–331.
11. Bandettini L. Increase of the mitotic index of colonic mucosa after cholecystectomy//Cancer. — 1986. — Vol. 58, № 3. — P. 685–687.
12. Craven P. A., Pfanstiel J., De Robertis F. R. Role of reactive oxygen in bile salt stimulation of colonic epithelial proliferation//J. Clin. Invest. — 1986. — Vol. 77. — P. 850–859.
13. De Robertis F. R., Craven P. A., Saito R. Bile salt stimulation of colonic epithelial proliferation. Evidence for involvement of lipoxygenase production//J. Clin. Invest. — 1984. — Vol. 74. — P. 1614–1624.
14. Castleden W. M., Detchon P., Misso N. Z. A. Biliary bile acids in cholelithiasis and colon cancer//Gut. — 1989. — Vol. 30. — P. 860–865.
15. Deschner E. E., Hallak A., Rosen P. et al. Prolonged administration of bile salts for gallstone dissolution and its effect on rectal epithelial cell proliferation//Dig. Dis. Sci. — 1987. — Vol. 32, № 9. — P. 991–996.
16. Юрин А. Г., Ковальский Г. Б. Исследование пролиферативной активности по экспрессии антигена Ki-67 в одиночных и множественных синхронных эпителиальных опухолях толстой кишки//Арх. пат. — 2005. — Т. 5. — С. 38–41.
17. Sahin A. A., Ro J. Y., Brown R. W. et al. Assessment of Ki-67-derived tumor proliferative activity in colorectal adenocarcinomas//Mod. Pathol. — 1994. — Vol. 7, № 1. — P. 17–22.
18. Berenzi A., Benetti A., Bertalot G. et al. Ki67 immunohistochemical evaluation in colorectal cancer and normal colonic mucosa. Possible clinical applications//Pathologica. — 1992. — Vol. 84. — P. 155–163.
19. Mills S. J., Shepherd N. A., Hall P. A. et al. Proliferative compartment deregulation in the non-neoplastic colonic epithelium of familial adenomatous polyposis//Gut. — 1995. — Vol. 36. — P. 391–394.
20. Hilska M., Collan Y. U., O'Laine V. J. et al. The significance of tumor markers for proliferation and apoptosis in predicting survival in colorectal cancer//Dis. Colon. Rectum. — 2005. — Vol. 48, № 12. — P. 2197–208.