

УДК 616.33/.342-002.44-005.1-08-092

© Н.М. Кононенко, К.В. Землянський, 2012.

## МОРФОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ МЕЛАТОНІНУ НА СТАН СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА ЩУРІВ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ГАСТРАЛЬНОЇ ВИРАЗКИ

**Н.М. Кононенко, К.В. Землянський***Національний фармацевтичний університет, кафедра патологічної фізіології (зав. – д.мед.н., проф. Н.М. Кононенко), м. Харків.*

### MORPHOLOGICAL STUDY OF THE EFFECT OF MELATONIN ON THE STATE OF THE GASTRIC MUCOSA OF RATS IN THE EXPERIMENTAL GASTRIC ULCER

**N. N. Kononenko, K.V. Zemlyansky**

#### SUMMARY

The introduction of serotonin in the gastric mucosa of animals' acute destructive changes mainly in the form of erosions and ulcers of various sizes and numbers, which are accompanied by a decrease in the amount of neutral mucopolysaccharides in the cytoplasm of the cell surface patching of the epithelium. The administration of melatonin in the gastric ulcer reduces the destructive changes in the gastric mucosa and restores the state of the protective mucus barrier.

### МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ МЕЛАТОНИНА НА СОСТОЯНИЕ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГАСТРАЛЬНОЙ ЯЗВЫ

**Н.Н. Кононенко, К.В. Землянский**

#### РЕЗЮМЕ

Введение серотонина вызывает в слизистой оболочке желудка животных острые деструктивные изменения преимущественно в виде эрозий и язв различного размера и численности, которые сопровождаются уменьшением содержания нейтральных мукополисахаридов в цитоплазме клеток поверхностно-ямочного эпителия. Введение мелатонина при гастральной язве уменьшает деструктивные изменения в слизистой оболочке желудка и восстанавливает состояние защитного слизистого барьера.

**Ключові слова: експериментальна виразка шлунка, серотонін, мелатонін.**

Виразкова хвороба шлунка і дванадцятипалої кишки - одна з найважливіших проблем сучасної клінічної медицини. Незважаючи на незаперечні успіхи впровадження в клінічну практику різних схем ерадикаційної терапії *Helicobacter pylori*, виразкова хвороба не залишає лідируючу групу захворювань травної системи. За даними світової статистики, на Європейському континенті виразкова хвороба зустрічається у 10% дорослого населення [4]. В результаті сучасного консервативного лікування загоєння гастродуоденальних виразок спостерігається у 80% хворих, проте у 60% виникає рецидив захворювання, що обумовлює вдосконалення схем лікування [3]. Протягом трьох останніх десятиліть у науковців зберігається інтерес до фізіологічних та фармакологічних властивостей гормону мелатоніну. Сьогодні про мелатонін говорять, мабуть, більше, ніж про будь-який інший гормон. Основним джерелом мелатоніну традиційно вважається мозкова заліза - епіфіз, пов'язана з організацією коливальних процесів в організмі, що дозволяло багато років розглядати його як суто хронобіотичний агент. Проте пізніше стало очевидним, що мелатонін має не тільки центральне, а й периферичне походження і може виконувати в організмі більш універсальну регуляторну роль. Цей нейрогормон синтезується клітинами APUD-системи

травного каналу, клітинами сітківки та циліарного тіла ока. Порушення продукції мелатоніну можуть брати участь у механізмах формування та хронізації захворювань внутрішніх органів. Уже доведені біоритмологічні, імуномодельючі та антигіпертензивні функції мелатоніну, тоді як участь його у регуляції інших процесів перебуває на етапі детального вивчення [2].

У зв'язку з цим, метою нашої роботи було вивчення впливу мелатоніну на стан слизової оболонки шлунка при експериментальній гастральній виразці.

#### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Досліди проведені на 30 білих нелінійних щурах-самцях масою 180-200 г. Виразку шлунка моделювали введенням 0,6% розчину серотоніну внутрішньоочеревинно три рази через 1 добу з розрахунку 0,5 мл на 100 г маси тіла тварини [9]. Мелатонін, розчинений в 1 мл фізіологічного розчину, вводили в дозі 2 мг/кг перорально. Тварин було розділено на три групи: 1 – інтактний контроль, 2 – модель виразки без лікування (контроль), 3 – тварини з виразкою шлунка, яких лікували мелатоніном. Об'єктом дослідження були зразки залозистої частини шлунка з місць візуальної локалізації геморагічних виразок та ерозій (ділянки

дна та препілоричної зони) у щурів. Лікування починали з 1 доби експерименту впродовж 7 діб. Виведення з експерименту всіх тварин проведено шляхом перетину сонної артерії на 8 день досліду. Після 10-ти хвилинної попередньої фіксації шлунок цілком дофіксували протягом 24 годин у такому ж розчині формаліну. При наявності на зразках виразки брали як саму виразку, так і її перифокальну зону. Зразки шлунка після фіксації зневоднювали у спиртах зростаючої міцності, заливали у целоїдин-парафін. Зрізи фарбували гематоксиліном та еозином, становили ШПК-реакцію за Мак-Манусом для виявлення глікопротеїнів - нейтральних мукополісахаридів (МПС) [5, 6]. На препаратах проводили напівкількісну оцінку патологічних змін слизової (за основу взято напівкількісну візуальну оцінку потужності гістохімічних реакцій за методом Соколовського [7] ) за такими показниками: 1 – виразність деструктивних змін (0 балів – пошкодження відсутні; 0,5 балів – поодинокі дрібні поверхневі ерозії – пошкодження тільки покривного епітелію з збереженням структури залоз та підлеглої строми; 1 бал – розповсюджені поверхневі ерозії без змін залозистих структур; 2 бали – одиничні дрібні виразки, глибина поразки залозистих трубок до  $\frac{1}{3}$  їх довжини; 3 бали – численні дрібні виразки або одиничні середні за розміром виразки з глибиною поразки до  $\frac{1}{2}$  довжини залоз; 4 бали – численні середні або одиничні великі виразки з поразкою  $\frac{2}{3}$  та більше довжини залоз); 2 – потужність гемокапілярних розладів поза зон деструкцій (0 балів – відсутність розладів; 1 бал – слабкі вогнищеві розлади; 2 бали – помірні дифузні розлади; 3 бали – виразні дифузні розлади); 3 – набряк слизової поза зон деструкцій (0 балів – відсутність ознаки; 1 бал – слабкий вогнищевий; 2 бали – помірний вогнищевий; 3 бали – виразний вогнищевий або дифузний); 4 – стан слизоутворюючих елементів шлунка (покривний та ямковий епітелій) поза зон деструкцій за виразністю ШПК-реакції (0 балів – фарбування відсутнє; 1 бал –

слабке фарбування, 2 бали – помірне фарбування, 3 бали – виразне фарбування). Статистичну обробку результатів проводили, застосовуючи критерій Мана-Уїтні. Для визначення статистичних розбіжностей використовували стандартний пакет програм “Statistica 6”. Перегляд мікропрепаратів проводили під мікроскопом Mikros 400 (Австрія), мікрофотографування мікроскопічних зображень здійснювали цифровим фотоапаратом Nikon Cool Pix 4500. Фотознімки обробляли на комп’ютері Pentium 2,4GHz за допомогою програми Nikon View 5.

#### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Макроскопічний огляд слизової залозистого відділу шлунка інтактних щурів показав нормальний рельєф складок, забарвлення притаманне здоровому шлунку. Поверхня слизової чиста. При мікроскопії видно, що слизова досліджених ділянок подана великою кількістю валиків, поверхня яких прикрита помірно високими циліндричними епітеліальними клітинами. Ядра містяться у базальній частині клітин, достатньо чітко розташовані у один ряд. Апікальні відділи цитоплазми багаті ШПК-позитивним секретом – нейтральними МПС, які є основним захисним компонентом слизового бар’єру. Шлункові ямки доволі глибокі, у клітинах, що вистеляють ямки, виявлено потужне ШПК-позитивне фарбування. Власні залози (дно шлунка) щільно розташовані, довгі. Територіальне розміщення та взаємовідношення у них залозистих клітин звичайне. Додаткові (слизові) клітини розташовані у шийки залоз, вони також приймають участь у процесі слизоутворення. Потужність ШПК-реакції в них виразна. Парієтальні клітини оксифільні, за кількістю превалюють над іншими залозистими клітинами, розповсюджені у більшості на Т! тіла залоз. Головні клітини переважають у базальних відділах залоз. Цитоплазма їх містить білкові гранули, що фарбуються гематоксиліном. Секреторна зона клітин широка, просвіт залоз помірний (рис. 1).

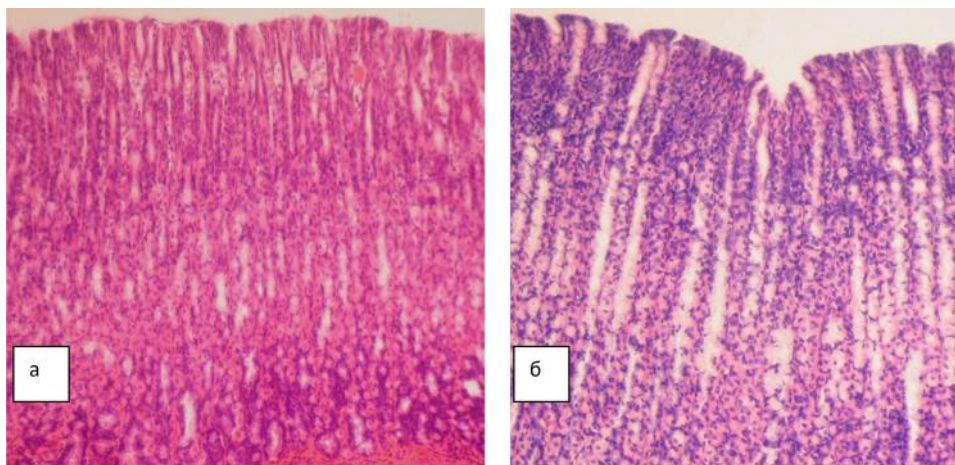


Рис. 1. Слизова шлунка інтактних щурів: а – ділянка дна, б – препілорична зона. Нормальний стан залозистих трубок. Гематоксилін-еозин. x100.

Інтермедіарні залози (препілорична зона, розташована між зоною дна та пілоричною ділянкою) складаються з тих же самих клітинних елементів, що і головні залози, але відрізняються від них зовсім іншими кількісними взаємовідношеннями. В них міститься значно більше додаткових клітин (вони навіть частково заміщують головні клітини у базальному відділі трубок), головні клітини в певній

мірі редуковані. Парієнтальні клітини мають те ж саме, що у головних залозах, розміщення. Строма слизової помірно повнокровна, містить варіабельну кількість лімфоцитів та еозинофільних клітин. М'язова пластинка слизової без особливостей. Підслизова оболонка незначна за товщиною, подана пухкою сполучною тканиною, в якій видні нормального вигляду кровоносні судини (рис. 2).

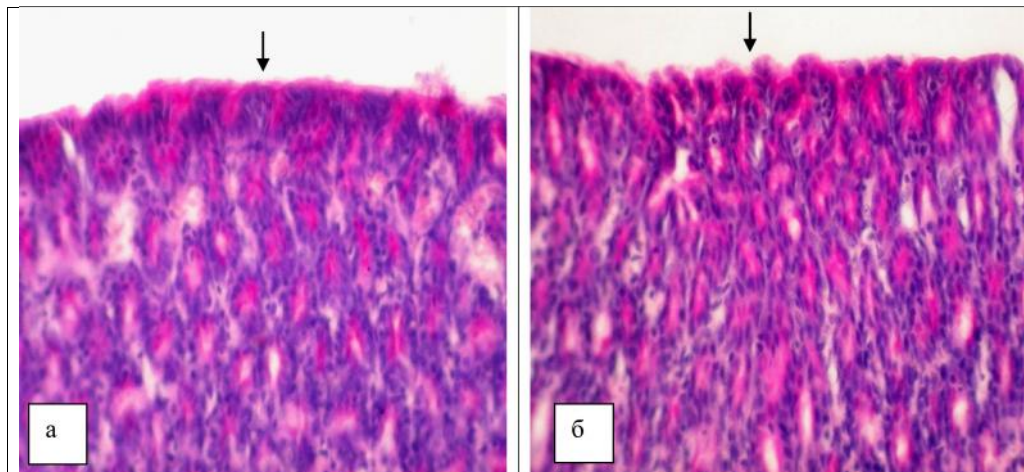


Рис. 2. Слизова шлунка інтактних щурів: а – дно, б – препілорична зона. Стан мукоїдної секреції у покривно-ямковому епітелію відповідає нормі. ШІК-реакція за Мак-Манусом. х200.

У всіх тварин з групи контрольної патології макроскопічно відмічена нечіткість рельєфу складок слизової, певна набряклість її, а у 75% щурів виявлені різні за чисельністю та розміром геморагічні виразки у області дна та препілоричної зони слизової. Мікроскопічно видно, що більша частина виразок

розповсюджувалися на всю товщу слизової. Залозисті структури, строма та навіть м'язова пластинка знаходилися у стані повної деструкції, мали місце масивні крововиливи, серед клітинного детриту іноді видні відкладення різної кількості пігменту (ржавий відтінок) (рис. 3).

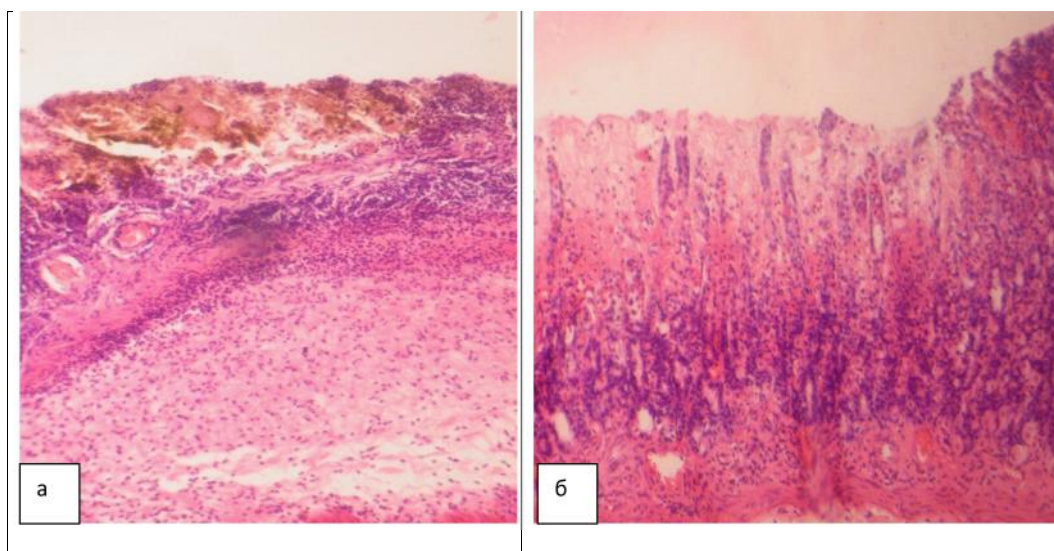
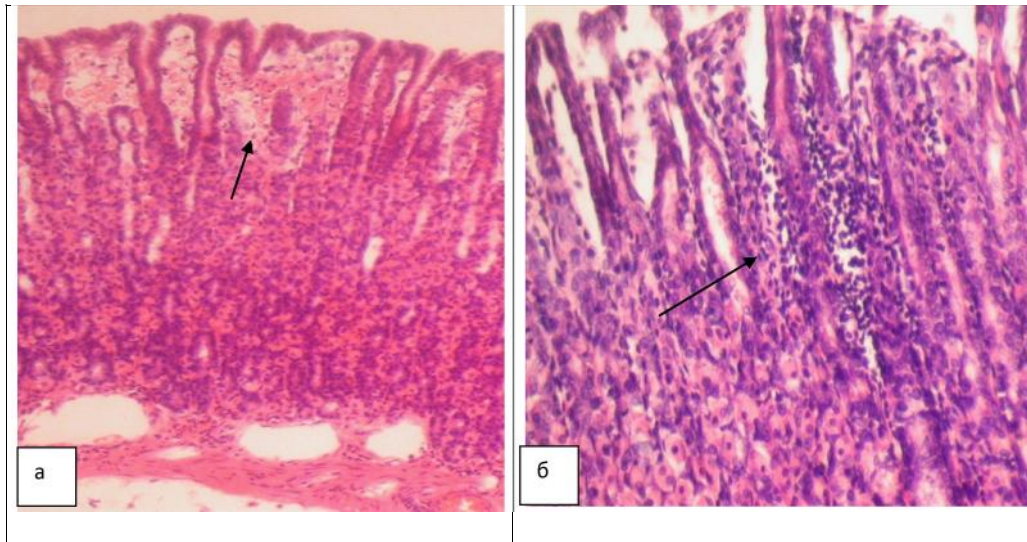


Рис. 3. Слизова шлунка щурів після введення серотоніну: а – ділянка дна (виразковий дефект з некрозом всіх шарів, набряк підслизового шару); б – препілорична зона (виразковий дефект з пошкодженням S глибини залозистих трубок). Гематоксилін-еозин. х100.

Решта дефектів була менш глибока, деструкція доходила до S глибини залозистих трубок. У збережених базальних відділах тіл таких залоз порушена чітка лінійність розташування, просвіт трубок часто розширено. Підслизовий шар під виразками виразно набряклий, кровоносні судини дилатовані, переповнені еритроцитами (стаз крові), нерідко крововиливи.

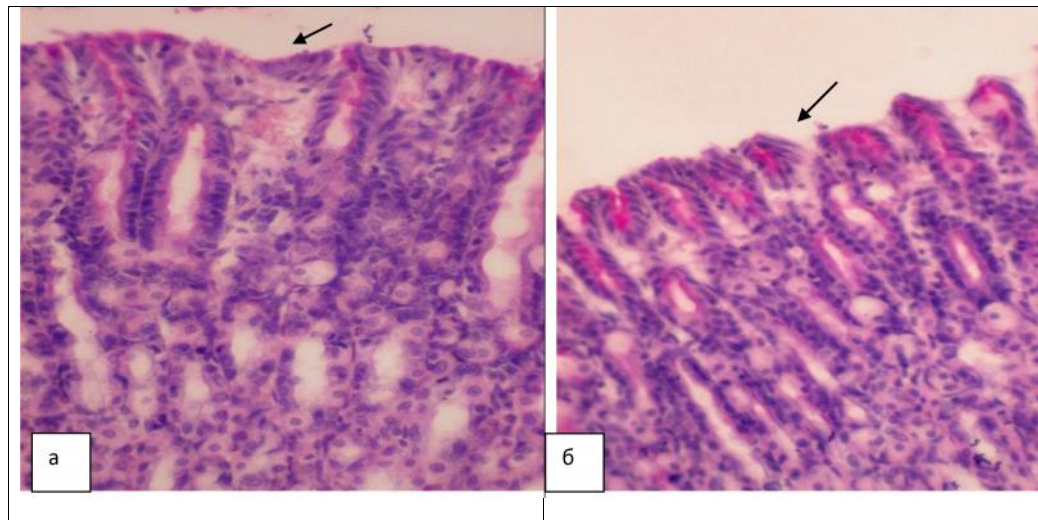
Поблизу кровоносних судин видні дрібні скупчення клітин (еозинофіли, лімфоцити, гістіоцити). На ділянках поза зон деструкцій спостерігали різні за виразністю розширення та повнокровність капілярної мережі, субепітеліальний набряк. Доволі часто простежені вогнищеві круглоклітинні інфільтрати у стромі (рис. 4).



**Рис. 4.** Слизова шлунка щурів після введення серотоніну. Ділянки поза зон деструкцій: а – виразний набряк підепітеліально, діapedезні крововиливи; б – круглоклітинний інфільтрат у стромі. Гематоксилін-еозин. x200.

Гістохімічне дослідження показало зниження інтенсивності ШК-реакції у цитоплазмі клітин, що приймають участь у процесі слизоутворення. У

цитоплазмі клітин покривного епітелію ШК-позитивний матеріал займав лише самі крайові зони, вміст його був знижено і у ямковому епітелію (рис. 5).



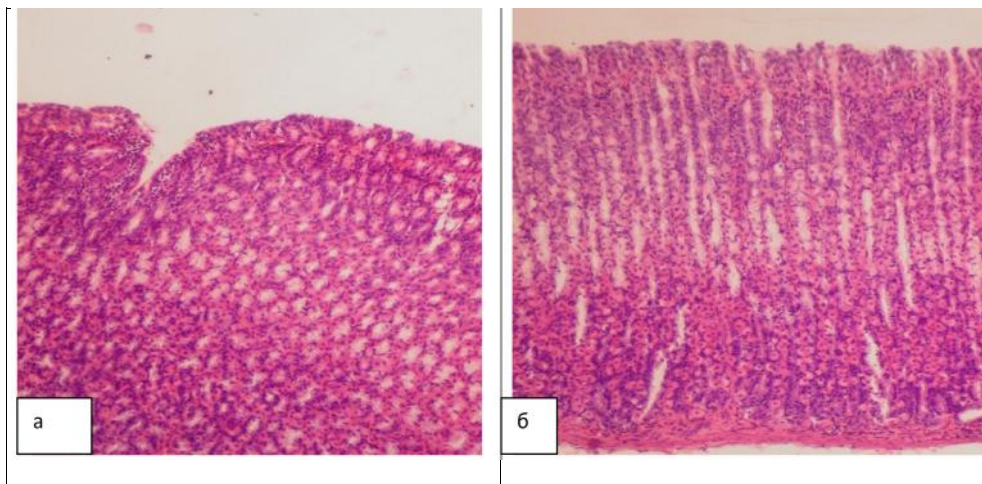
**Рис. 5.** Слизова шлунка щурів після введення серотоніну. Виразне зменшення ШК-позитивного матеріалу у цитоплазмі покривного, а місцями і ямкового епітелію поза зон деструкцій: а – ділянка дна; б – препілорична зона. ШК-реакція за Мак-Манусом. x250.

Тобто відбувалося виразне зменшення вмісту нейтральних МПС у цитоплазмі клітин поверхневого та ямкового епітелію – основного компонента захисного слизового бар'єру. Вважають, що саме пригнічення слизового бар'єру є першопричиною

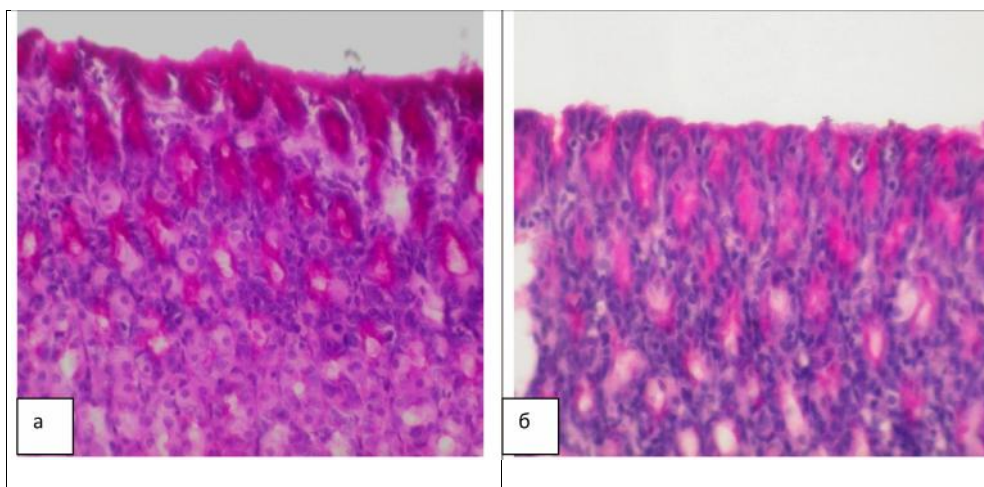
розвитку пошкодження слизової оболонки шлунка [1, 8]. Всі ці зміни відбувалися на тлі розладів кровообігу, у першу чергу капілярної підепітеліальної мережі, наслідком чого є пошкодження цілісності судинних стінок, крововиливи та набряк стромі.

Після лікування мелатоніном слизова шлунка щурів макроскопічно характеризувалася більш чітким рельєфом складок, ерозивних пошкоджень не виявлено. При світлооптичному дослідженні структурна організація досліджених ділянок слизової

наближена до норми, покривні епітеліальні клітини функціонально активні, виразність ШІК-реакції у клітинах покривно-ямкового епітелію достатня. Відмічено лише деяку повнокровність капілярів підепітеліально (рис. 6, рис.7).



**Рис. 6.** Слизова шлунка щурів, яких лікували мелатоніном: а – ділянка дна, б – препілорична зона. Морфологічна структура покривного епітелію та залозистих трубок не порушена, підепітеліально дещо підвищено повнокровність капілярів. Гематоксилін-еозин. x100.



**Рис. 7.** Слизова шлунка щурів, яких лікували мелатоніном: а – ділянка дна, б – препілорична зона. Вміст нейтральних мукополісахаридів у клітинах покривно-ямкового епітелію достатній. ШІК-реакція Мак-Манусом. x250.

Рис. 7. Слизова шлунка щурів, яких лікували мелатоніном: а – ділянка дна, б – препілорична зона. Вміст нейтральних мукополісахаридів у клітинах покривно-ямкового епітелію достатній. ШІК-реакція Мак-Манусом. x250.

Згідно з поставленими завданнями була проведена напівкількісна оцінка стану слизової залозистого шлунка щурів різних груп (табл.1).

Як видно з поданих у таблиці 1 даних мелатонін виразно зменшує деструктивні зміни в 5,8 рази порівняно з контролем у ділянках залозистого епітелію слизової оболонки шлунка щурів.

Гемокапілярні розлади знизилися у 1,67 рази, практично зник набряк строми слизової. Під впливом мелатоніну у 2 рази підвищується інтенсивність ШІК-реакції у клітинах покривного та ямкового епітелію, тобто нормалізувався процес слизоутворення.

#### ВИСНОВКИ

1. Введення серотоніну викликає у слизовій шлунка тварин гострі деструктивні зміни переважно у вигляді ерозій та виразок різного розміру та чисельності, які супроводжувалися зменшенням вмісту нейтральних МПС у цитоплазмі клітин поверхнево-ямкового епітелію.

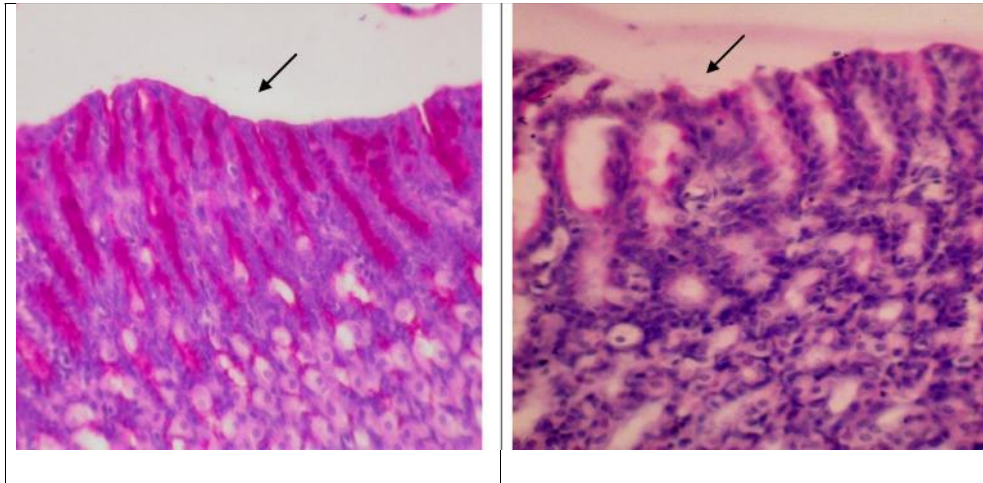


Рис. 8. Слизова шлунка щурів, яких лікували мелатоніном. Різна потужність ШІК-реакції: а – нормальна (ділянка дна), б – знижена (препілорична зона). ШІК-реакція Мак-Манусом. х250.

Таблиця 1

Виразність патологічних змін у слизовій оболонці шлунка щурів

Експериментальні групи	Показники (M±m, бали)			
	Деструкція слизової	Гемокапілярні розлади	Набряк	ШІК-реакція
Інтактні щури	0	0,5±0,1	0	2,75±0,3
Контроль	2,9±0,3*	1,63±0,4*	2,0±0,3*	1,25±0,2*
Виразка + мелатонін	0,5±0,4**/	1,0±0,2**/	0,12±0,1**/	2,5±0,3**/

Примітки: \*p<0,05- достовірно відносно інтактних тварин; \*\* p<0,05 – достовірно відносно контролю.

2. Мелатонін має гастропротекторні властивості, загоюючи дефекти слизової оболонки та відновлюючи стан захисного слизового бар'єру.

ЛІТЕРАТУРА

1. Актуальные вопросы гастроэнтерологии. Сборник трудов. Под ред. В.Х. Василенко /Г.В. Цодиков, Ю.П.Толмачев, Л.Н Денисов. Изменение слизистого барьера желудка человека при воздействии на него аспирина и индометацина. М. , 1972. –С. 119-126.

2. Анисимов В. Н. Мелатонин роль в организме, применение в клинике /В.Н. Анисимов // СПб.: Издательство «Система», 2007. – 40 с.

3. Вдовиченко В.І. Лікування виразкової хвороби /В.І. Вдовиченко // Київ, ІВЦ АЛКОН. – 2004. – С.- 85.

4. Маев И.В. Язвенная болезнь /И.В. Маев, А.А. Самсонов //М.: Миклош, 2009 – 428 с.

5. Меркулов Г.А. Курс патологистологической техники /Г.А. Меркулов // М.: Медицина, 1969. - 424с.

6. Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная /пер. с англ. – М.: Изд-во иностран. лит. – 1962. – 962 с.

7. Соколовский В.В. Гистохимические исследования в токсикологии /В.В. Соколовский // Л.: Медицина, 1971. – 176 с.

8. Успенский В.М. Функциональная морфология слизистой оболочки желудка /В.М. Успенский // Л.: Наука, 1986. – 291с.

9. Яковлева Л.В. Експериментальне вивчення нових противиразкових препаратів / Л.В. Яковлева, Г.В. Оболенцева, Л.П. Брюзгінова // Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рек.; за ред. чл.-кор. АМН України О.В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – С. 321–333.