

УДК 612.325: 612.6.057:616.33-002.44

В.В. Гнатюк, Н.М. Кононенко*, Г.А. Божок***

**Національний фармацевтичний університет, м. Харків*

***Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, м. Харків*

ДОСЛІДЖЕННЯ КІЛЬКОСТІ МЕЛАТОНІН-ПОЗИТИВНО-МІЧЕНИХ КЛІТИН У ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ ТА СТАТІ З ВИРАЗКОВИМ УРАЖЕННЯМ ШЛУНКА

Методом імуногістохімічного забарвлення досліджено кількість мелатонін-позитивно-мічених клітин слизової оболонки шлунка у щурів різного віку та статі з виразковим ураженням шлунка. В ході експерименту встановлено, що виразкове ураження слизової оболонки шлунка призводить до зниження загальної кількості та морфологічних змін мелатонін-позитивно-мічених клітин слизової оболонки шлунка у щурів різної статі та віку. Найбільші кількісні та якісні зміни мелатонін-позитивно-мічених клітин спостерігається у щурів-самців віком 9 та 15 місяців, що відповідає віку людини 29–30 та 43–44 роки.

Ключові слова: виразка шлунка, стать, вік, імуногістохімія.

Відповідно до сучасних уявлень про розвиток виразкової хвороби вивчення ролі апудоцитів гастроентеропанкреатичної ендокринної системи є дуже актуальним [1, 2]. Існують поодинокі дані про зв'язок захворювань травного тракту з морфофункціональними змінами у клітинах нейроендокринної системи слизової оболонки шлунка (СОШ) [3–5]. При цьому питання, які поєднані з механізмом ураження СОШ при виразковій хворобі, і одночасно комплексна оцінка стану ентерохромафінних клітин, які продукують мелатонін, залишаються до кінця не розкритими. А відомості про морфофункціональну активність мелатонінпродукуючих клітин СОШ у тварин або людини різного віку та статі на тлі виразкового ураження шлунка в сучасній літературі відсутні. Тому метою нашої роботи стало вивчення кількості мелатонін-позитивно-мічених клітин СОШ у щурів різного віку та статі з виразковим ураженням шлунка.

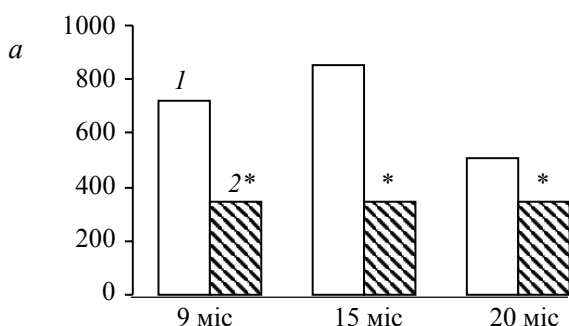
Матеріал і методи. Дослідження проведено на 402 зрізах слизової оболонки пілоричного відділу шлунка щурів різної статі віком 9, 15 та 20 місяців, що відповідає віку людини 29–30, 43–44 та 55–56 років. Зразки були отримані від тварин, які були розподілені на 12 груп: 1-ша–3-тя – інтактний контроль (самці відповідного віку); 4-та–6-та – інтактний контроль (самки відповідного віку); 7-ма–

9-та – експериментальні – самці відповідного віку, яким моделювали виразку шлунка методом спиртопреднізолонного ушкодження – внутрішньошлунково вводили преднізолон в дозі 20 мг/кг, що був розчинений у 80%-вому етиловому спирті в дозі 6 мл/кг [6]; 10-та–12-та – експериментальні – самки відповідного віку з виразковим ушкодженням. Використано метод імуногістохімічного забарвлення з первинними антитілами до мелатоніну (Biorbyt, Великобританія) та вторинними Alexa Fluor 488 кон'югованими антитілами (Abcam, Великобританія). Ядра були забарвлені пропідію йодидом (Sigma, США). Флюоресценцію спостерігали на мікроскопі Olympus IX-71 (Японія) при довжині хвилі 519 нм для Alexa Fluor 488 і 617 нм для пропідію йодиду. Клітини в зразках підраховували при збільшенні: окуляр 10, об'єктив 40. Серійні зрізи виконували за допомогою програми ImageJ 1.48a (NIH) та перераховували на 1 мм². Усі втручання та евтаназію тварин проводили згідно з вимогами комісії з біоетики НФаУ та «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах», що узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних і інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та першого Національного конгресу з біоетики (Київ, 2001). Статистичну достовірність оці-

нювали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу, достовірною вважали різницю при $p < 0,05$ [7].

Результати. Тридцять дев'ять зрізів СОШ (близько 10 %) з експериментальних груп не підлягали аналізу у зв'язку з наявністю запального процесу, який проявлявся порушенням будови слизової оболонки, набряком. У інтактних тварин різної статі усіх вікових груп мелатонін-позитивно-мічені клітини (МПК) були представлені трьома типами: 1-й тип – дрібні клітини діам. 3,8–7,6 мкм, що знаходяться переважно в базальному відділі шлункової залози; 2-й – великі клітини діам. 11 – 17 мкм без гранул в цитоплазмі; 3-й тип – великі клітини з гранулами в цитоплазмі, які займають базальний та середній відділи залози. При цьому в зразках усіх тварин представлені всі види клітин з переважанням клітин 1-го та 2-го типів, за винятком самців віком 20 місяців, у яких спостерігали переважно 1-й та 3-й типи МПК.

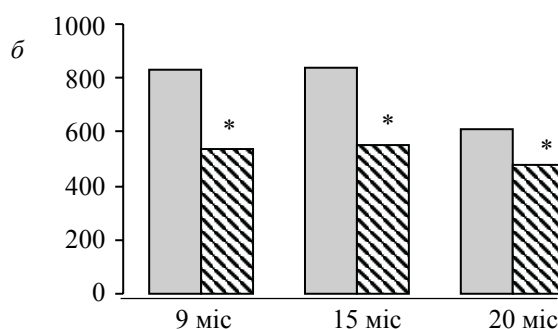
При підрахунку загальної кількості МПК встановлено, що їх кількість у СОШ на тлі виразкового ураження знижується в усіх експериментальних групах (рисунок).



На тлі зниження загальної кількості МПК у СОШ при виразковому ураженні шлунка відбуваються зміни в співвідношенні різних типів клітин та їх морфологічної будови (таблиця).

Так, у самців віком 9 місяців у порівнянні з інтактними щурами відповідного віку у досліджених зрізах відсутні клітини 3-го типу, а переважають клітини 1-го типу, які мають у 1,5–2,0 рази менші розміри. У самців віком 15 місяців МПК на 100 % представлені тільки клітинами 1-го типу, а у самців 20 місяців на тлі збереження всіх типів клітин переважають клітини 1-го та 2-го типів. У самок усіх вікових груп значних змін у співвідношенні клітин не спостерігається.

Обговорення результатів. Отримані результати свідчать про морфологічні зміни, які відбуваються в нейроендокринній системі СОШ на тлі виразкового ураження, а саме зміни кількості та морфологічної будови МПК СОШ. Зниження кількості МПК в усіх експериментальних групах свідчить про запальні та деструктивні процеси, які розвиваються в СОШ при виразковому ураженні. При цьому звертають на себе увагу зміни в



Кількість мелатонін-позитивно-мічених клітин слизової оболонки шлунка щурів-самців (а) та щурів-самок (б) різного віку контрольних груп (1) і з виразковим ураженням шлунка (2).

* $p < 0,05$ – відносно інтактного контролю

При цьому достовірні відмінності між кількістю клітин у тварин різного віку відсутні. Відносно контролю найбільше зниження спостерігається у самців віком 9 та 15 міс. – на 52 та 60 % відповідно ($p < 0,05$). У самок відповідного віку зниження кількості МПК в цих вікових групах відносно контролю становить 35 % у самок віком 9 місяців та 34 % у самок віком 15 місяців ($p < 0,05$). Звертає на себе увагу те, що у щурів віком 20 місяців зниження МПК найменше в порівнянні з іншими віковими групами та складає відносно контролю 31 % у самців і 23 % у самок ($p < 0,05$).

співвідношенні клітин за морфологічною будовою. Так, як у самців, так і у самок груп інтактного контролю віком 20 місяців спостерігається збільшення МПК 2-го та 3-го типів порівняно з тваринами віком 9 та 15 місяців. Враховуючи, що клітини цих типів знаходяться в базальних і середніх відділах шлункових залоз і містять гранули мелатоніну, це збільшення, ймовірно, можна вважати компенсаторною відповіддю на зниження рівня пінеального мелатоніну у зв'язку з віковою атрофією епіфізу [8]. Можна припустити, що дані морфологічні зміни СОШ призводять до підвищення синтезу мелатоніну в ентеро-

Показники різних типів МПМК у щурів різного віку та статі з виразковим ураженням шлунка

| Група | Вік /тип клітин, % | | | | | | | | |
|--|--------------------|-----|-----|--------|-----|-----|--------|-----|-----|
| | 9 міс | | | 15 міс | | | 20 міс | | |
| | 1-й | 2-й | 3-й | 1-й | 2-й | 3-й | 1-й | 2-й | 3-й |
| Інтактний контроль Експериментальна | <i>Самці</i> | | | | | | | | |
| | 40 | 47 | 13 | 27 | 60 | 13 | 50 | 7 | 43 |
| Інтактний контроль Експериментальна | <i>Самки</i> | | | | | | | | |
| | 51 | 35 | 14 | 39 | 41 | 20 | 40 | 52 | 8 |
| Інтактний контроль Експериментальна | 52 | 48 | 0 | 100 | 0 | 0 | 49 | 41 | 10 |
| | 52 | 39 | 9 | 44 | 40 | 16 | 45 | 48 | 7 |

хромафінних клітинах шлунка та реалізації його ролі в якості паракринної сигнальної молекули для локальної координації клітинних функцій і міжклітинних зв'язків в нормі і в разі патології. При цьому підвищення концентрації мелатоніну в міжклітинному просторі та на поверхні СОШ сприяє реалізації його цитопротекторних і антиоксидантних ефектів [8–10]. На тлі виразкового ураження найбільші морфологічні зміни відбуваються у самців віком 9 та 15 місяців. У зразках щурів-самців цих експериментальних груп відсутні клітини 3-го типу, що можна пояснити дією спиртопреднізолонного ушкодження на клітини СОШ, а також протекторними властивостями, які притаманні мелатоніну, та були повністю реалізовані у відповідь на пошкодження СОШ шляхом випорожнення великих клітин з гранулами МПМК (3-й тип). У щурів-самців віком 20 місяців також відбулося зниження МПМК 3-го типу на 33 %, але ж деяка частина їх (10 %) збереглася.

Таким чином, враховуючи кількісні і морфологічні зміни, які відбуваються у сам-

ців віком 9 та 15 місяців, що відповідає віку людини 29–30 та 43–44 роки, можна пояснювати більшу захворюваність на виразкову хворобу у чоловіків відповідного віку [11, 12]. Значні зміни, що відбуваються в співвідношенні різних типів клітин у щурів віком 15 місяців (відповідає віку людини 43–44 роки), можуть бути однією із причин більш високої частоти ускладнень виразкової хвороби в цій віковій групі.

Висновки

1. Виразкове ураження слизової оболонки шлунка призводить до зниження загальної кількості мелатонін-позитивно-мічених клітин у щурів різної статі та віку.

2. Найбільше зниження кількості мелатонін-позитивно-мічених клітин спостерігається у щурів-самців віком 9 та 15 місяців, що відповідає віку людини 29–30 та 43–44 роки.

Перспективи досліджень: планується вивчення мелатонін-позитивно-мічених клітин у щурів різної статі та віку з виразковим ураженням слизової оболонки шлунка на тлі десинхронозу.

Список літератури

1. Кулиджанов А.Ю. Мелатонинпродуцирующие и NO-синтазоположительные клетки желудка и процессы клеточного обновления при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки / А.Ю. Кулиджанов, М.А. Осадчук // Клиническая медицина. – 2005. – № 9. – С. 34–37.
2. Роль диффузной эндокринной системы и клеточного гомеостаза эпителиоцитов слизистой оболочки желудка в возникновении и течении язвенной болезни двенадцатиперстной кишки / И.М. Кветной, М.А. Осадчук, А.М. Осадчук, Е.А. Исламова / Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2009. – № 4. – С. 19–24.
3. Диффузная нейроэндокринная система желудка и показатели пролиферации в реализации каскада Коррея при заболеваниях, ассоциированных с *Helicobacter pylori* / А.А. Свистунов, Н.В. Киреева, М.А. Осадчук, И.М. Кветной // Клиническая медицина. – 2015. – № 11. – С. 35–41.
4. Осадчук М.А. Функциональные расстройства желудочно-кишечного тракта в контексте морфофункционального единства / М.А. Осадчук, А.М. Осадчук, С.Н. Николенко // Клиническая медицина. – 2014. – № 7. – С. 29–34.

5. Роль апуд-системы желудка в прогрессировании хронического хеликобактерного гастрита / М.А. Осадчук, А.А. Сибиряев, Н.В. Киреева, И.М. Кветной // Клиническая медицина – 2013. – № 5. – С. 42–45.

6. Стефанов О.В. Доклінічні дослідження лікарських засобів : Метод. рекомендації / О.В. Стефанов. – К. : Видавничий дім «Авіцена», 2001. – С. 323.

7. Методы статистической обработки медицинских данных : метод. рекомендации. для ординаторов и аспирантов мед. учеб. заведений, науч. работников / А.Г. Кочетов, О.В. Лянг, В.П. Масенко и др. – М.: РКНПК, 2012. – 42 с.

8. Бондаренко Л.А. Некоторые гормональные механизмы ускоренного старения при гипопитuitarизме / Л.А. Бондаренко // Достижения та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології : наук.-практ. конф. Чотирнадцяті Данилевські читання : матер. конф. – Харків, 2015. – С. 14–20.

9. Bruno Claustrat. The basic physiology and pathophysiology of melatonin / Bruno Claustrat, Jocelyne Brun, Guy Chazot // Sleep. Med. Rev. – 2005. – Vol. 9. – P. 11–24.

10. Konturek S.J. Melatonin in gastroprotection against stress-induced acute gastric lesions and in healing of chronic gastric ulcers / S.J. Konturek, P.C. Konturek, T. Brzozowski // J. Physiology and Pharmacology. – 2006. – Vol. 57, № 5. – P. 51–66.

11. Исламова Е.А. Возрастные особенности язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки / Е.А. Исламова // Саратовск. научн.-мед. журнал. – 2009. – Т. 5, № 4. – С. 569–571.

12. Крылов Н. Перфоративная язва: патоморфоз, коллизии и тренды / Н. Крылов, Д. Винничук // Врач. – 2012. – № 1. – С. 15–20.

В.В. Гнатюк, Н.Н. Кононенко, Г.А. Божок

ИССЛЕДОВАНИЕ КОЛИЧЕСТВА МЕЛАТОНИН-ПОЛОЖИТЕЛЬНО-МЕЧЕННЫХ КЛЕТОК У КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА И ПОЛА С ЯЗВЕННЫМ ПОРАЖЕНИЕМ ЖЕЛУДКА

Методом иммуногистохимического окрашивания исследовано количество мелатонин-положительно-меченных клеток слизистой оболочки желудка у крыс разного возраста и пола с язвенным поражением желудка. В ходе эксперимента установлено, что язвенное поражение слизистой оболочки желудка приводит к снижению общего количества и морфологическим изменениям мелатонин-положительно-меченных клеток слизистой оболочки желудка у крыс разного пола и возраста. Наиболее выраженные количественные и качественные изменения мелатонин-положительно-меченных клеток наблюдаются у крыс-самцов возрастом 9 и 15 месяцев, что соответствует возрасту человека 29–30 и 43–44 года.

Ключевые слова: язва желудка, пол, возраст, иммуногистохимия.

V.V. Hnatiuk, N.N. Kononenko, G.A. Bozhok

THE STUDY OF NUMBER OF MELATONIN-POSITIVE-LABELED CELLS IN RATS OF DIFFERENT AGE AND SEX WITH GASTRIC ULCER

The number of melatonin-positive-labeled cells of the gastric mucosa in rats of different age and sex with ulcer of the stomach was studied by method of immunohistochemical staining. The experiment found that ulcerative lesion of the gastric mucosa leads to a decrease in the total number and morphological changes of melatonin-positive-labeled cells of the gastric mucosa rats of different sex and age. The most expressed quantitative and qualitative changes in the melatonin-positive-labeled cells observe in male rats aged 9 and 15 months that corresponds to the age of the person 29–30 and 43–44 years.

Key words: gastric ulcer, sex, age, immunohistochemistry.

Поступила 05.08.16