

УДК 612.315-018.73:612.014.33:616.329-002-092.9:615.375

© Р.О. Піняжко, М.Р. Гжегоцький, О.І. Терлецька, В.І. Ковалишин
Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

ПЕРСПЕКТИВИ ЗАСТОСУВАННЯ МЕЛАТОНІНУ ЯК ЦИТОПРОТЕКТОРНОГО ЗАСОБУ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЕЗОФАГІТІ НА ТЛІ ГІПОТИРЕОЗНО ДИСФУНКЦІ

ПЕРСПЕКТИВИ ЗАСТОСУВАННЯ МЕЛАТОНІНУ ЯК ЦИТОПРОТЕКТОРНОГО ЗАСОБУ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЕЗОФАГІТІ НА ТЛІ ГІПОТИРЕОЗНО ДИСФУНКЦІ – Досліджували ступінь деградації міжнуклеосомно ДНК у клітинах слизової оболонки стравоходу за умов одинарної та поєднаної дії експериментального езофагіту і гіпотиреозу. Ефект застосування мелатоніну у групах з експериментальним езофагітом, а також езофагітом на тлі гіпотиреозу універсально виявлявся зміщенням шляху розпаду клітин із некрозу до апоптозу. Застосування мелатоніну у всіх дослідних групах сприяло відновленню цілісності поверхневих шарів епітелію, що свідчить про покращання якості постстресової адаптації.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕЛАТОНИНА КАК ЦИТОПРОТЕКТОРНОГО СРЕДСТВА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЭЗОФАГИТЕ НА ФОНЕ ГИПОТИРЕОИДНОЙ ДИСФУНКЦИИ – Исследовали степень деградации межнуклеосомной ДНК в клетках слизистой оболочки пищевода в условиях одинарного и совместного действия экспериментального эзофагита и гипотиреозной дисфункции, и коррекции этих состояний мелатонином. Эффект применения мелатонина в группах с экспериментальным эзофагитом на фоне гипотиреоза, универсально проявлялся смещением пути распада клеток из некроза к апоптозу.

PROSPECTS OF USAGE OF MELATONIN AS CYTOPROTECTIVE AGENT UNDER THE COMBINED CONDITIONS OF EXPERIMENTAL ESOPHAGITIS AND HYPOTHYROIDOSIS – The level of DNA degradation in esophageal mucosa cells under the combined conditions of experimental esophagitis and hypothyroidosis and correction with melatonin, were investigated. The effect of usage of melatonin in groups with experimental esophagitis, and esophagitis with hypothyroidosis was exposed by the way of cell destruction from necrosis to apoptosis.

Ключові слова: слизова оболонка стравоходу, езофагіт, гіпотиреоз, мелатонін, апоптоз, ультраструктура.

Ключевые слова: слизистая оболочка пищевода, эзофагит, гипотиреоз, мелатонин, апоптоз, ультраструктура.

Key words: esophageal mucosa, esophagitis, hypothyroidosis, melatonin, apoptosis, ultrastructure.

ВСТУП Погіршення екологічної ситуації в Україні зумовлює стабільну тенденцію до зростання випадків гіпотиреозу і дисфункції [2, 3]. Гіпотиреоз є неспецифічним станом, який видозмінює оксидативний гомеостаз організму, пригнічуючи потужність локальних цитопротекторних механізмів [2, 3]. Поліпотентний вплив і універсальність біологічних ефектів гормонів щитоподібно залози, участь у підтримці компенсаторно-відновних процесів обґрунтовує актуальність дослідження механізмів ульцерогенезу дистальних відділів стравоходу на тлі гіпофункції щитоподібно залози. Важливість даної проблеми доводиться аналізом літературних джерел, що засвідчують значне поширення гастроєзофагеальної рефлюксно-хвороби (ГЕРХ), часто поєднаної з ендокринною дисфункцією [1, 2]. Водночас відсутні фундаментальні відомості про значення тиреоїдного гомеостазу для реалізації морфологічного ремоделювання слизової оболонки (СОС)

за різних екстремальних умов. Великий інтерес для з'ясування механізмів, що забезпечують цитопротекторні властивості стравоходу, має аналіз реалізації механізмів клітинного циклу. Метою нашого дослідження стало, зважаючи на специфіку ультраструктурних клітинних перебудов, обґрунтувати можливість застосування мелатоніну для підвищення регенераторної здатності слизової оболонки за умов експериментального езофагіту на тлі гіпотиреозу і дисфункції.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ Дослідження проводили на 70 статевозрілих щурах-самцях з дотриманням нормативів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для наукових цілей. Експериментальний езофагіт індукували шляхом введення методом зовнішньої перфузії кислотно-пепсиново-суміші впродовж 7 днів (1-ша серія). Експериментальний гіпотиреоз моделювали шляхом введення тиреостатичного препарату "Мерказоліл" впродовж 28 днів у дозі 16 мг/кг (2-га серія). Ще одній групі дослідних тварин на тлі розвитку гіпотиреозу індукували експериментальний езофагіт (3-я серія). Окремих груп всіх дослідних серій (1-3) 7 днів вводили мелатонін (внутрішньочеревинно у дозі 20 мг/кг). Суспензію клітин дистального відділу СОС тварин контролю та дослідних груп використовували для виділення та очищення фрагментованої ДНК класичним методом ДНК-драбинок, що вважається характерною ознакою апоптозу [9]. Після розділення фрагментованої ДНК останню візуалізували на транслюмінаторі та фотографували. Мікроультраструктуру епітеліального бар'єра стравоходу всіх дослідних груп вивчали рутинним методом забарвлення гематоксилін-еозином та електронно-мікроскопічною фотографією.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ Проведені нами електронно-мікроскопічні дослідження свідчать, що розвиток експериментального езофагіту, як і гіпотиреозу і дисфункції, виявляються ультраструктурними змінами, які засвідчують порушення епітеліального бар'єра СОС. Водночас поміж клітин СОС, у яких переважають дистрофічно-деструктивні процеси, зафіксовані клітини з ознаками пристосувальних реакцій. Універсальною була зміна міжклітинних взаємодій, розширення міжклітинного простору, порушення структурованості внутрішньоклітинних утворів, часто вакуолізація епітеліальних клітин, особливо базального його шару, відшарування епітелію від підслизового шару. Динаміка ультраструктурних перебудов відповідала характеру апоптичних та некротичних змін у СОС різних дослідних груп.

Розвиток експериментального гіпотиреозу супроводжувався значною активацією проапоптичних процесів у клітинах СОС щурів, що проявлялось у вигляді міжнуклеосомно апоптоз-специфічної деградації ДНК цих клітин (рис. 1). В аналогічній дослідній групі тварин при використанні як коригуючого засобу "Мела-

тонін" рівень деградовано ДНК знижувався у 4 рази. За умов експериментального езофагіту ступінь вираженості апоптичних процесів був практично однаковим як і у тварин із гіпотиреозом (рис. 1). В окремих особин із проаналізовано загальною популяцією тварин з езофагітом загибель епітеліальних клітин стравоходу відбувалась як шляхом апоптозу, так і шляхом некрозу. Використання мелатоніну у тварин цієї групи виявлялось істотним зниженням вираженості ультраструктурних проапоптичних змін у СОС, ступінь яко була істотно нижчою, ніж у групі з гіпотиреозом дисфунк-

цією. Відстежено не лише вірогідне зниження фрагментації ДНК, але і зміщення відсотка переважання механізму загибелі клітин із некрозу до енергозалежного апоптозу, що свідчить про зменшення міри гіпоксичного ураження та підвищення активності аеробного метаболізму. На користь відновлення високоефективного мітохондріального окисного метаболізму при застосуванні мелатоніну свідчить також, зафіксоване нами у попередніх дослідженнях, вірогідне зниження концентрації метаболітів анаеробного гліколізу та продуктів ліпопероксидації у тканині СОС [5].

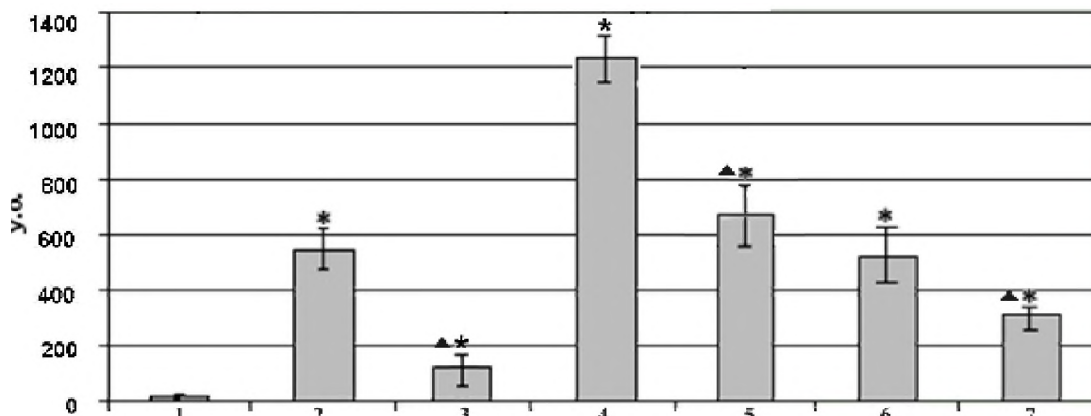


Рис. 1. Активність апоптозіндукованої деградації ДНК клітин СОС за умов езофагіту на тлі гіпотиреозу та корекції мелатоніном.

1. Контроль, 2. Гіпотиреоз, 3. Гіпотиреоз + мелатонін, 4. Гіпотиреоз + езофагіт, 5. Гіпотиреоз + езофагіт + мелатонін, 6. Езофагіт, 7. Езофагіт + мелатонін.

Примітка. * – вірогідність щодо контролю;

▲ – вірогідність щодо кожної з дослідних груп (3 щодо 2; 5 щодо 4; 7 щодо 6).

Найвищий ступінь вираженості деструктивних змін у СОС був у групі з моделюванням езофагіту на тлі гіпофункції щитоподібно залози. Насамперед, це проявлялось порушенням цілісності рогового шару шляхом деструктуризації клітинних утворів, збільшення розмірів міжклітинних просторів та десквамацією клітин у просвіт стравоходу (рис. 2,а). Міжклітинні контакти між клітинами зернистого шару були порушені і часто плазматичні мембрани сусідніх клітин зливались між собою (рис. 2,б). Основні цитоплазматичні органи мали ознаки лізису, виявлялись дрібні гранули кератогіаліну. Клітини остистого та базального шарів епітелію містили гіпертрофовані ядра, а їх цитоплазма була збіднена на рибосоми, полісоми, мітохондрії. Характерною особливістю можна вважати різноманітні зміни якості та кількості мітохондрій, що свідчать про їх дисфункцію, а відповідно про стан деенергізації. Зміна архітекtonіки мітохондрій значною мірою відповідає механізму розпаду клітин, що співзвучне з даними літератури стосовно виключно ролі мітохондріальних механізмів у каскаді внутрішньоклітинних апоптозних реакцій деградації [7, 8].

У ряді випадків клітини базального шару мали дуже високу електронну щільність цитоплазми та ядра, що може трактуватись як свідчення апоптозу, тоді як інші, поруч розташовані, розпадались шляхом некрозу (рис. 2,в). Зафіксовані докази геморагічно-деструктивних процесів (рис. 2,г), що істотно погіршувало трофічне забезпечення відновних процесів.

Застосування мелатоніну у щурів з езофагітом на тлі гіпотиреозу, як і у серіях дослідних тварин з односторонньою дією езофагіту або гіпофункції, демонструвалось кращою збереженістю ультраструктур стосовно серій без використання коригуючого засобу. Для рогового шару епітелію властивою була значна кількість щільно прилеглих одна до одної клітин (рис. 3,а). Зернистий шар епітелію був представлений оптимально розвинутими клітинами зі значною кількістю гранул кератогіаліну, дрібних мітохондрій, компонентів ендоплазматичного ретикулуму, рибосом та полісом. Ядра цих клітин були насичені еухроматином та містили чітко структуровані ядерця (рис. 3,б). Плазматичні мембрани клітин остистого та базального шарів мали чіткий профіль, по всьому своєму периметру формували міжклітинні контакти, серед яких вирізнялись десмосоми. Характерною була наявність клітин, що мали велике ядерно-цитоплазматичне співвідношення. У перинуклеарних ділянках таких клітин, особливо базального шару, зафіксована значна кількість добре структурованих мітохондрій, рибосом, полісом (рис. 3,в). При цьому відмічено підвищення площі контакту між суміжними елементами як свідчення структурно-функціональних взаємодій, що і забезпечують підвищення ефективності внутрішньоклітинної репарації. Прилегла до базального шару епітелію сполучна тканина вирізнялася присутністю розвиненої сітки оптимально розвинених гемокапілярів, фібробластів, колагенових волокон. Ендотеліальні клітини були оптимально структурованими (рис. 3,г), що в цілому покращувало локальний кровоплин.

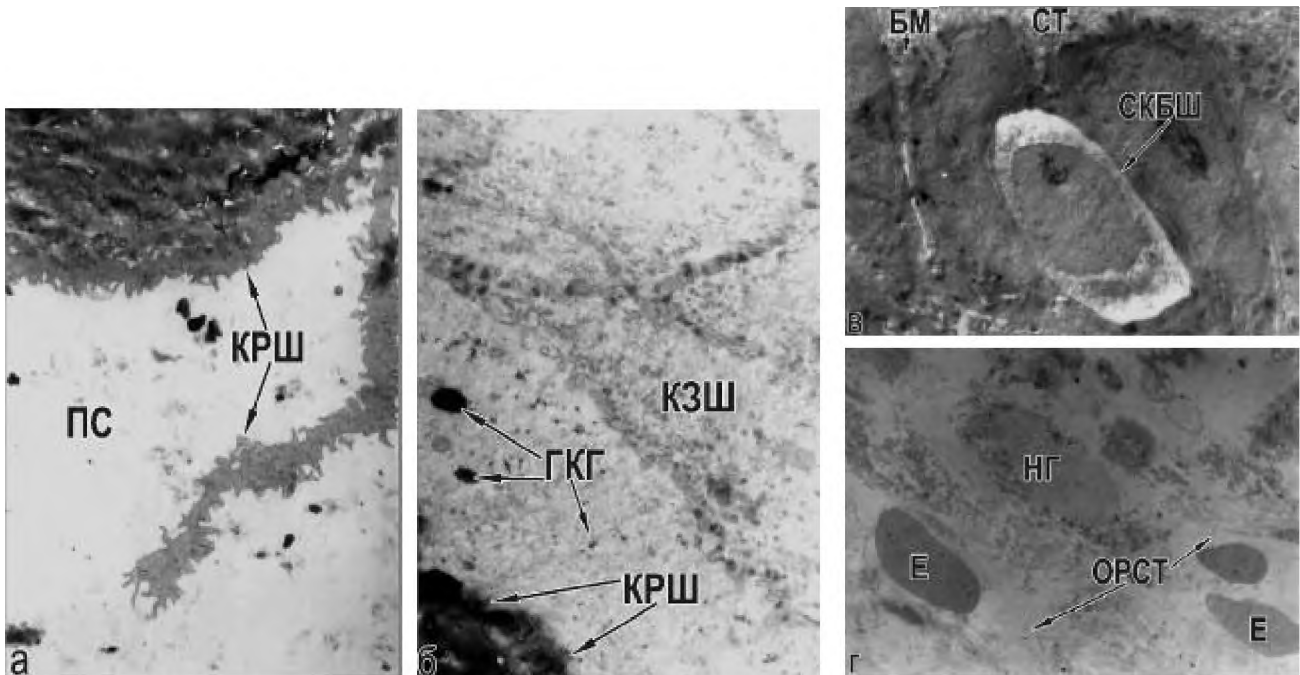


Рис. 2. Ультраструктура слизової оболонки нижньої третини стравоходу білих щурів на 7-й день розвитку езофагіту на тлі 28-денного гіпотиреозу:

- а – відшаровані у просвіт стравоходу клітини рогового шару. 36×2100 ;
- б – в стані набряку та лізовані клітини зернистого шару. 36×2800 ;
- в – електронно-світла клітина базального шару епітелію у стані некрозу. 36×2800 ;
- г – дезорганізована сполучна тканина, що містить дегранульований нейтрофільний гранулоцит, гемолізовані еритроцити. 36×2100 .

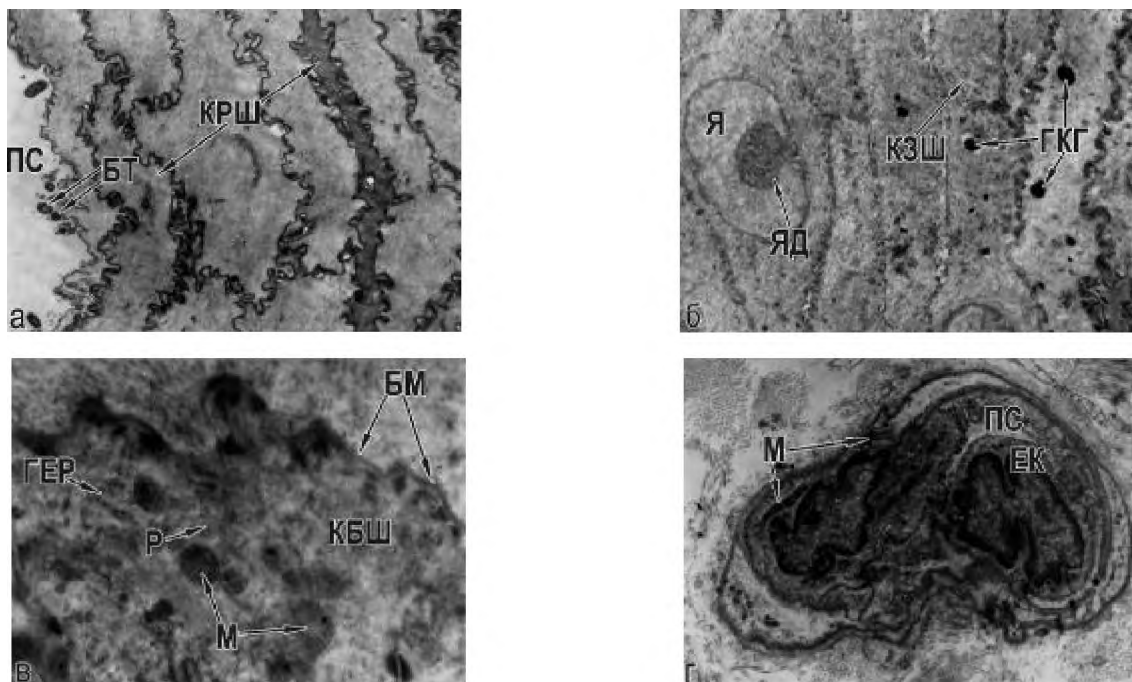


Рис. 3. Ультраструктура слизової оболонки нижньої третини стравоходу білих щурів на 7-й день розвитку езофагіту на тлі 28-денного гіпотиреозу, за умов корекції мелатоніном:

- а – середньо електронно щільності клітини рогового шару епітелію. 36×2100 ;
- б – оптимально розвинуті клітини зернистого шару епітелію. 36×2800 ;
- в – цитоплазма клітин базального шару вповнена мітохондіями, рибосомами, компонентами гранулярного ендоплазматичного ретикулуму. 36×7000 ;
- г – судина, що організована оптимально розвинутими ендотеліальними клітинами, які містять значну кількість мітохондрій. 36×4500 .

Слід зауважити, що практично у всіх тварин з езофагітом на тлі гіпотиреозу зафіксована некроз-специфічна деградація ДНК клітин СОС. Рівень фрагментації ДНК у СОС цих щурів, що майже у 2,5 раза перевищує відповідні значення у групах лише з езофагітом або гіпотиреозом, свідчить про сумачію ефектів ініціації процесів деградації ДНК за умов поєднаного патології (рис. 1) і підтверджує важливу роль гормонів тиреоидного контуру для забезпечення компенсаторно-адаптаційних процесів. Застосування мелатоніну у цій групі щурів виявлялось зниженням майже вдвічі ступеня міжнуклеосомно апоптоз-індукованої деградації ДНК клітин тканини СОС щурів. Важливим є той факт, що при використанні мелатоніну у всіх дослідних групах спостерігається не лише вірогідне зниження фрагментації ДНК, але і зміщення шляху загибелі клітин з некрозу на користь апоптозу, що відповідає характеру описаних вище ультраструктурних змін, і доводить роль мелатоніну як важливого фактора регуляції клітинного циклу. Це узгоджується з даними літератури, які доводять роль гормонів дифузної ендокринної системи стравоходу, і, зокрема, мелатоніну, у ендогенних механізмах регуляції проліферації та клітинної смерті, що має виключне значення у патогенезі та перебігу ГЕРХ. Підвищення мелатоніно-імунітетивних клітин при ерозивній формі ГЕРХ вважається протективним механізмом, спрямованим на обмеження індукованого ушкодження [6]. Таким чином, виявляються ефекти мелатоніну як важливого паракринного регулятора гомеостатичності основних функцій шлунково-кишкового тракту [4, 10–13].

Співставляючи отримані нами результати з даними фахової літератури, універсальний цитопротекторний ефект мелатоніну у групах тварин з експериментальними езофагітом, гіпотиреозом, а також з поєднанням, можна пов'язати із залученням шляхів нормалізації енергетичного обміну клітин, спрямованим на оптимізацію механізмів індукції, регуляції та реалізації апоптозу, як механізму завершення клітинного циклу, що за умов адекватної його мобілізації може забезпечувати структурно-метаболическу основу локальної репарації. Водночас широкий спектр фізіологічних ефектів мелатоніну значною мірою, пов'язаний з поєднанням паракринних та генералізованих ефектів дії мелатоніну.

ВИСНОВКИ Узагальнюючи отримані результати можна стверджувати, що ефект застосування мелатоніну у групах з експериментальним езофагітом, а також езофагітом на тлі гіпотиреозу універсально ви-

являвся зміщенням шляху розпаду клітин з некрозу до апоптозу, що доводить можливу участь мелатоніну у регуляції клітинного циклу. Застосування мелатоніну у всіх дослідних групах сприяло відновленню цілісності поверхневих шарів епітелію, що свідчить про покращання якості постстресорної адаптації.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Безштанько М.А., Городенко Л.К. Ультраструктурні особливості парієтальних клітин залоз тіла шлунка тиреодектомованих щурів, лікованих L-тироксинам // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2009. – № 2. – С. 29–31.
2. Болезни щитовидной железы / Под ред. Л.И. Бравермана. – М.: Медицина, 2000. – С. 140–173.
3. Макарян Р.Д. Субклінічний гіпотиреоз: сучасна оцінка і підходи до лікування // Експерим. та клініч. едокринол. – 2003. – № 3. – С. 79–85.
4. Опарин А.А. Влияние препарата мелатонина мелаксен на функцию эндотелия при дуоденальной язве, ассоциированной с *Helicobacter Pylori* // Сучасні проблеми медицини. – 2009. – № 3. – С. 31–33.
5. Піняжко Р.О. Активність апоптозу клітин слизової оболонки стравоходу за умов експериментального езофагіту та корекції його мелатоніном // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2010. – № 3. – С. 45–48.
6. Роль дифузної нейроендокринної системи в патогенезі і исходе гастроэзофагеальной рефлюксной болезни / М.А. Осадчук, А.В. Калинин, Т.Е. Липатова и др. // Рос. Журн. Гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. – 2007. – № 3. – С. 35–39.
7. Тканиноспецифічність морфологічних проявів апоптозу / Л.О. Стеченко, Т.П. Куфтирева, В.А. Петренко та ін. // Таврический медико-биологический вестник. – 2006. – Т.9, № 3. – С. 191–194.
8. Фильченков А.А., Стойка Р.С. Апоптоз и рак. – К.: Морион, 1999. – 184 с.
9. Rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments / M. Herrmann, H.M. Lorenz, R. Voll, M. Grunke, W. Woith, J.R. Kalden // Nucleic Acids Res. – 1994. – № 22. – P. 506–507.
10. Mucosal strengthening activity of central and peripheral melatonin in the mechanisms of gastric defence / Brzozowska T., Ptak-Belowska A., Pawlik M. [et al.] // J. Physiol. Pharmacol. – 2009. – №7. – P. 47–56.
11. Protective influence of melatonin against acute esophageal lesions involves prostaglandins, nitric oxide and sensory nerves / Konturek S.J., Zayachkivska O., Havryluk X.O. [et al.] // J. Physiol. Pharmacol. – 2007. – № 58. – P. 361 – 377.
12. Protective effects of melatonin against caustic esophageal burn injury in rats / Larios-Arceo F., Ortiz G.G., Huerta M. [et al.] // J. Pineal. Res. – 2008. – № 45. – P. 219–223.
13. Cytoprotective influence of melatonin on the morpho-functional integrity of the epithelial barrier of esophageal mucous membrane under conditions of experimental hypergastrinemia / Pinyazhko R., Kovalyshyn V., Zayachkivska O., Grzegotsky M. // Bridges in Life Sciences Annual Scientific Review. / – 2009. – P. 146.

Отримано 11.10.2010