

УДК: 616.33-005.1-036-089-092.9

**В.Й. Мамчур,
С.О. Мунтян,
В.П. Кришень,
М.В. Трофімов,
О.В. Макаренко**

ПАТОМОРФОЛОГІЧНИЙ СТАН СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА ТА ОСОБЛИВОСТІ ОБМІНУ NO ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ МОДЕЛЮВАННІ ГОСТРОЇ КРОВОТОЧИВОЇ ВИРАЗКИ

Дніпропетровська державна медична академія
кафедра загальної хірургії
(зав. - д. мед. н., проф. С.О. Мунтян)
кафедра фармакології, клінічної фармакології та фармакоекономіки
(зав. - д. мед. н., проф. В.Й. Мамчур)

Ключові слова: експериментальна
виразка шлунка,
гастродуоденальна кровотеча
Key words: experimental gastric
ulcer, gastroduodenal bleeding

Резюме. Проведен морфологический анализ патоморфологических процессов в слизистой оболочке желудка у крыс с экспериментальной язвой по Такаяшу. Произведено исследование концентрации стабильных метаболитов NO в сыворотке крови. В слизистой оболочке периаульцерозной зоны наблюдаются явления апоптоза клеток, выраженная лейкоцитарная инфильтрация, дилатация артериол, расширение капилляров и венул, множественные диapedезные кровоизлияния. Установлено резкое повышение концентрации NaNO_3 сыворотки крови, что можно объяснить активацией ферментов циклооксигеназного цикла. Установленные признаки могут быть использованы в дальнейшем поиске эффективных методов лечения гастродуоденального кровотечения.

Summary. The morphological analysis of pathomorphological processes in the gastric mucous membrane in rats with an experimental ulcer by Takayashu is conducted. Research of concentration of stable NO metabolites in the blood serum was performed. In the mucous membrane of periulcerous area the phenomena of cells apoptosis, severe leukocytic infiltration, dilatation of arterioles, capillaries and venules, multiple diapedesis bleedings were observed. A sharp increase of NaNO_3 concentration in the blood serum was set; this may be explained by activating of enzymes of cyclooxygenase cycle. The revealed signs may be used in the further research for effective methods of treatment and prognosis of gastroduodenal bleeding.

Лікування кровоточивих виразок гастродуоденальної зони залишається актуальною проблемою в хірургії та ендоскопії [7]. За даними різних авторів, спостерігається постійне зростання числа випадків кровоточивої виразки від 7 до 12% [7,12]. У сучасній літературі відсутня інформація про характер патоморфологічних та патофізіологічних змін у зоні кровоточивого дефекту при активній кровотечі. Провести подібне дослідження можливо тільки в експерименті, оскільки у клініці виконання його небезпечно для хворого. Відомо, що адекватною моделлю кровоточивої гастродуоденальної виразки у людини можна вважати формування кровоточивої виразки у лабораторних тварин. Кровоточиву виразку моделюють в експерименті у шлунку щурів. Враховуючи високу стабільність відтворення і значний рівень однорідності морфогенезу виразок цього типу, багато дослідників використовують різні експериментальні моделі для дослідження патофізіологічних та

патоморфологічних змін в організмі дослідної тварини. Характер змін слизової оболонки свідчить про перебіг патогенетичних механізмів утворення кровоточивої виразки та сприяє пошуку найбільш ефективних методів лікування цього грізного ускладнення.

Метою роботи є визначення біохімічних особливостей обміну NO у щурів з кровоточивою виразкою в тісному зв'язку з морфологічним станом кровоточивого дефекту слизової оболонки верхніх відділів травного тракту.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Експеримент був проведений на 30 білих щурах - самцях популяції Вістар, масою 180-220 г. При проведенні експерименту дотримувались міжнародних рекомендацій про проведення медико-біологічних досліджень із використанням тварин згідно з Європейською конвенцією [9]. У дослідах на тваринах використовується багато моделей, проте деякі з них надто травматичні,

супроводжуються суттєвим ураженням печінки, що утруднює інтерпретацію біохімічних показників. Використовували модель кровоточивої виразки за Такаюшу та в модифікації дослідників Національного інституту фармакології України [6,11]. Запропонована модель утворення кровоточивої виразки не викликає труднощів при відтворенні, тривалість загоювання виразок не менш ніж 14 днів. Тварини були розподілені на дві групи. Щурам першої групи проводили формування гострої стресової виразки шляхом гострого іммобілізаційного стресу за методом Сел'є [2,4,8,13]. Після доби голодування експериментальних тварин іммобілізували у положенні на спинці протягом 12 годин. При цьому проходило формування гострої стресової виразки. Після цього тварин тримали у голодуванні протягом 12 годин. Після вказаного проміжку часу щурам вводили внутрішньобрюшинно серотонін у дозі 40 мг/кг маси для формування виразкової кровотечі.

Другій групі експериментальних тварин проводили формування нестероїдної виразки. Після доби голодування щурам протягом трьох діб вводили внутрішньошлунково через зонд розчин індометацину в дозі 20 мг/кг маси. При цьому проходило формування медикаментозної виразки. Після цього тварин тримали у голодуванні протягом 12 годин. Після вказаного проміжку часу щурам вводили внутрішньобрюшинно серотонін у дозі 40 мг/кг маси для формування виразкової кровотечі. Групою контролю були 10 інтактних щурів. Через годину після ін'єкції проводили евтаназію тварин шляхом декапітації під ефірним наркозом.

Шлунок тварин розтинали за великою кризною та промивали ізотонічним розчином натрію хлориду при температурі 37⁰С. Проводили макроскопічну оцінку отриманого препарату з визначенням глибини та площі дефекту слизової оболонки (виразковий індекс та виразковий ступінь). Для гістологічного дослідження матеріал брали з краю виразки або біля краю некрозу. Використовували забарвлення зрізів гематоксилін-еозином за загальноприйнятими методиками та за методом М.З.Слінченка і Скарпелі [1,10], що дозволяє виявити м'язовий, сполучнотканинний та судинний компоненти стінки шлунка. Також проводили аналіз метаболітів оксиду азоту в сироватці крові дослідних тварин за Грисом [3]. До 0,2 мл біоматеріалу додавали 2,0 депротейнізатора та інкубували 15 хв. при температурі 27-30⁰С. Потім проби центрифугували при 1500 об./хв. протягом 20 хв.

Надосад кількісно переносили в чисту пробірку й додавали 1 мл реактиву Гриса. Проби залишали на 15 хв. при кімнатній температурі, після цього спектрофотометрували при 540 нм. Контролем служили 2 мл дистильованої води та 1 мл реактиву Гриса.

Статистичну обробку результатів дослідження проводили з використанням критерію Стьюдента [5].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При дослідженні інтактних тварин товщина слизової оболонки шлунка поза складками була рівномірною. У залозах слизової оболонки добре визначались головні, парієтальні та додаткові клітини, а також більш темні клітини фізіологічної регенерації. У тварин дослідних серій слизова оболонка шлунка була нерівномірно потовщена за рахунок набряку строми. У зоні ушкодження спостерігались некротичні зміни тканини та формування кров'яного згустку. Характерними ознаками оточуючих ділянок були набряк, гіперемія, чисельні геморагії. Величина виразкового ступеня складала у першої групи (іммобілізаційна виразка) 2,2 бала, у другої (індометацинова виразка) - 3,2 бала. У першій групі виразковий індекс складав 0,978 бала, а в другій - 0,968 бала.

При мікроскопічному дослідженні встановлений набряк клітин покривного епітелію у перифокальній зоні формування виразки. Епітеліоцити мали великі розміри, що може бути пов'язано з набряком самих клітин. Спостерігаються явища апоптозу клітин – відзначаються гіперхромні ядра та цитоплазма з гідропічною слизовою дистрофією. На рівні між'яткових валиків спостерігається виражена поліморфноклітинна інфільтрація з перевагою лімфоїдних елементів. У залозистому епітелії спостерігається значна кількість межепітеліальних лімфоцитів, що розміщені на базальному епітелії. Під поверхневим епітелієм по всій товщі слизової оболонки спостерігається помірний набряк та виражена інфільтрація лейкоцитами, що свідчить про різке підвищення проникності судин за рахунок пошкодження їх базальної мембрани. У підслизовому шарі спостерігається масивна лейкоцитарна інфільтрація, дилатація артеріол, розширення просвіту гемокапілярів, венул, а також локальне повнокров'я, множинні діapedезні крововиливи. Поряд із цим спостерігається переважання кількості межепітеліальних лімфоцитів, розміщених у базальній частині плазматичних клітин, наявність множинних лімфатичних фолікулів (рис.1, 2).

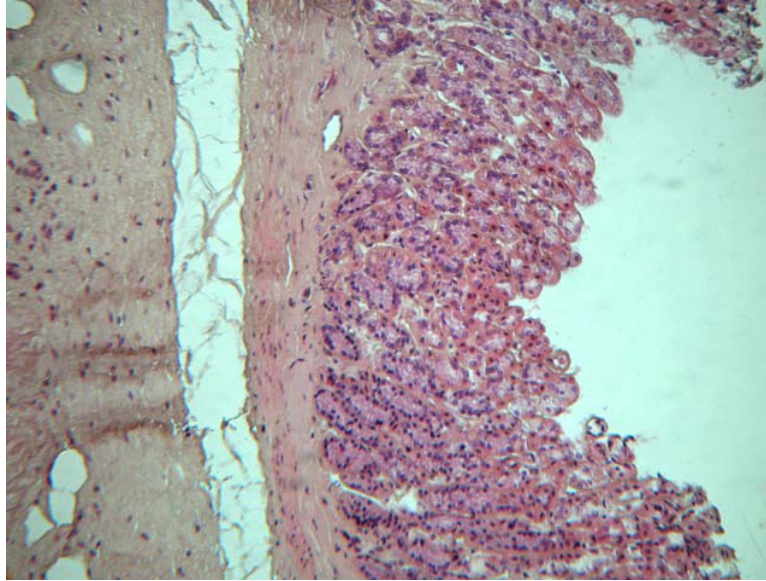


Рис. 1. Забарвлення гематоксилін-еозином. Зона виразкового дефекту. Дистрофічні зміни, апоптоз клітин. Дифузний еритродіapedез. Поліморфно-клітинна інфільтрація на рівні ямок та шийок залоз. 1x250

Виявлені зміни свідчать про асептичне запалення за імунним типом із дистрофічно-некротичними процесами в слизовій оболонці.

При визначенні стабільних метаболітів оксиду азоту в сироватці крові спостерігається різке зростання концентрації NaNO_3 у дослідних

тварин. У першій групі концентрація NaNO_3 становить $10,09 \pm 2,32$ мкмоль/л ($p < 0,05$), а другій групі - $28,7 \pm 5,23$ мкмоль/л, ($p < 0,05$). У контрольній групі цей показник склав $2,89 \pm 0,54$ мкмоль/л.

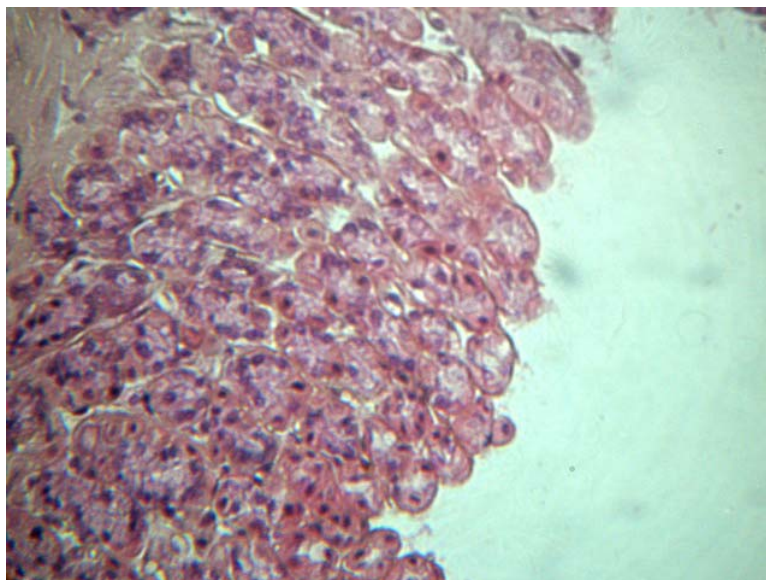


Рис.2. Забарвлення гематоксилін-еозином. Зона виразкового дефекту. Дистрофічні зміни, апоптоз клітин. Дифузний еритродіapedез. Поліморфно-клітинна інфільтрація на рівні ямок та шийок залоз. Дистрофічні зміни поверхневого епітелію. набряк та поліморфно-клітинна інфільтрація власного шару. 1x250

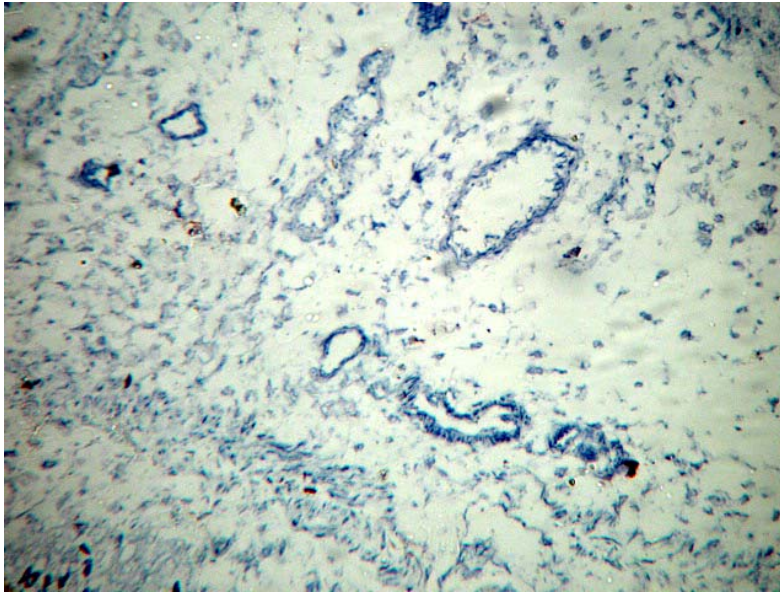


Рис. 3. Забарвлення за Скарпеллі. Виражена дилатація судин періульцерозної зони. 2x250

Спостерігається найбільше зростання концентрації NaNO_3 у випадках з високим виразковим індексом та виразковим ступенем до $52,49 \pm 5,27$ мкмоль/л, при величині виразкового ступеня 4 бали.

Цей факт можна пояснити активним синтезом оксиду азоту в періульцерозній зоні слизової оболонки шлунка завдяки активації циклооксигеназного механізму, до складу якого входять індукцйбельна NO-синтаза та НАДФ-діафораза. Ці ферменти активно продукуються при розпаді тромбоцитів та макрофагами і активуються цитокінами лімфоцитів. При збільшенні продукції NO спостерігається виражена вазодилатація, блокування вазоконстрикції, пригнічення тромбоутворення. Ці зміни можуть сприяти розвитку кровотечі.

При моделюванні кровоточивої виразки виявлені патоморфологічні та патофізіологічні зміни слизової оболонки періульцерозної зони. Отримані дані можуть бути використані в подальшому дослідженні та оцінці ефективності різних методів лікування гастродуоденальної кровотечі.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Аруин Л.И., Капуллер Л.Л., Исаков В.А. Морфологическая диагностика заболеваний желудка и кишечника. – М.: Триада, 1998. - 483 с.

2. Василишин Р.Й., Щербинина М.Б., Мішалов В.Д. Морфологічні показники регенеративних процесів виразкового дефекту у слизовій оболонці шлунка щурів // Вісник проблем біології та медицини. - 2002. - №2. - С.50-54.

ВИСНОВКИ

1. Запропонована модель утворення кровоточивої виразки є адекватною моделлю виникнення кровоточивої виразки у людини, не викликає труднощів при відтворенні та дає змогу використовувати цю модель у клініці.

2. Зростання кількості міжепітеліальних лімфоцитів на тлі лейкоцитарної інфільтрації з формуванням множинних вогнищ лімфатичних фолікулів підтверджує наявність асептичного запалення в слизовій оболонці шлунка при гострій кровоточивій виразці.

3. При гострій кровоточивій виразці спостерігається різке зростання концентрації стабільних метаболітів NO в сироватці крові. Це відбувається за рахунок підвищення активності індукцйбельної NO-синтази циклооксигеназного циклу, наслідком чого є дилатація артеріол, розширення просвіту гемокапілярів, венул, а також локальне повнокров'я, множинні діapedезні крововиливи, що може сприяти розвитку кровотечі.

геморагічних гастритах // Вісник наукових досліджень. – 2003. - №3. – С.24-25.

5. Иванов Ю.И., Погорелюк О.Н. Статистическая обработка результатов медико-биологических исследований на микрокалькуляторах и по программам. – М.: Медицина, 1996.-221 с.

6. Модель ерозивно-виразкового ураження гастродуоденальної зони /Мещинен І.Ф., Яремій І.М., Волошин О.І. [та ін.] / Експериментальна фізіологія та біологія. – 2004.- №2.- С.27-29.

7. Никишаев В.И., Гичка С.Г., Бойко В.В. Экспериментальное исследование эффективности различных методов эндоскопического гемостаза // Український журнал малоінвазивної та ендоскопічної хірургії. – 2005. - №1-2. – С.6-11.

8. Подзорова А.В. Методы экспериментального моделирования язв в разных отделах желудочно-кишечного тракта // Вісник проблем біології та медицини. - 1999. - №2. –С.48-52.

9. Рекомендації II національного конгресу України з біоетики // Журнал АМН України. – 2004. – Т.10, № 4. – С.827-829.

10. Скрипник М.І. Біохімічні механізми розвитку виразки шлунка за умов стресу // Український біохімічний журнал. – 2001. - №1.- С.110-114.

11. Стефанов А.В. Оценка специфической фармакологической активности лекарственных средств. – К.: Авиценна, 2002.- 567с.

12. Тактика и результаты хирургического лечения гастродуоденальных язв, осложнённых острым кровотечением, в специализированном центре желудочно-кишечных кровотечений // Шепетько Е.Н., Фомин П.Д., Заплавский А.В. [и др.] // Клінічна хірургія. – 2007. - №5-6. – С.88.

13. Ezer E., Szporny L. Prevention of experimental gastric ulcer in rats by a substance // J.Pharm.Pharmacol. – 1970.- Vol.22, N2. – P.143-159.

