

Ю. А. Калініченко, І. В. Бобришева, А. О. Бобришева

ОСОБЛИВОСТІ ЗМІН СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ЩУРІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ СТРЕСОВОМУ УРАЖЕННІ ВЕРХНІХ ВІДДІЛІВ ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО ТРАКТУ

ГЗ «Луганський державний медичний університет»

Актуальність. Виразкові ураження (ВХ) шлунка і дванадцятипалої кишки – найбільш серйозні та небезпечні хронічні захворювання шлунково-кишкового тракту. За сучасними епідеміологічними даними, на ці захворювання страждають до 10% дітей із хронічною патологією шлунково-кишкового тракту [1], яка вже давно посідає перше місце за поширеністю в популяції дітей шкільного віку (72,3 – 87,5%). Найчастіше ВХ формується в осіб підліткового віку чоловічої статі в період інтенсивного «стрибка росту» (12-15 років), коли відбувається нейроендокринна перебудова організму, на фоні хронічного гастриту та гастродуоденіту. Особливістю ВХ у підлітків є доведене превалювання стресових факторів формування захворювання та множинність локусів ураження слизової оболонки шлунка (СОШ).

Незалежно від багаторічного вивчення питань етіології та патогенезу ВХ підліткового віку клініцистами і патофізіологами ця проблема залишається нерозв'язаною тому, що під час формування і розвитку захворювання діють складні та багатофункціональні патогенетичні чинники, де провідними є порушення нервових, гормональних і місцевих механізмів регуляції травлення. Одними з таких чинників є неспецифічні протеїнази. Основним джерелом неспеци-

фічних протеїназ у локусі запальної реакції є поліморфноядерні лейкоцити і макрофаги, що першочергово мобілізуються до вогнища запалення з метою захисту від ушкодження як епітелію, так і сполучнотканинних структур [2]. Визначення протеолітичної активності та протидіючого інгібіторного потенціалу в різних біологічних середовищах є раннім і достатньо чутливим тестом, що свідчить про патологічні зміни в тканинах, зокрема – про деструктивний компонент.

Матеріали і методи. Експериментальні дослідження ми проводили на 16 білих щурах-самців лінії Вістар вагою 150-200 г, які перебували в стандартних умовах віварію. Були сформовані експериментальна і контрольна групи по 8 тварин у кожній. Експериментальну гастродуоденальну стресову виразку (СВ) моделювали за рахунок іммобілізації тварин, які голодували протягом 24 год. у тісних клітках-пеналах у положенні на животі протягом 6 год. при температурі 8°C [4]. Стан протеїназ-інгібіторної системи вивчали в шлунковому змиві, супернатанті гомогенату слизової оболонки шлунка. Експериментальні дослідження проводилися відповідно до вимог «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в дослідницьких і інших наукових цілях» (Strasburg, 1986) [3]. Трипсиноподібну активність

(ТПА) вимірювали методом спектрофотометрії, що ґрунтується на вимірюванні швидкості відщеплення N-бензоїл-L-аргініну від синтетичного субстрату N-бензоїл-L-аргініну етилового ефіру. Вимірювання еластазоподібної активності (ЕПА) проводили за результатами гідролізу синтетичного субстрату N-т-бок-аланіл-п-нітрофінілового ефіру. Рівень кислотостабільних інгібіторів (КСІ) визначали за результатами розщеплення синтетичного субстрату бензоїл-D-аргініну-паранітроанілід-монохлориду [5], концентрацію білка визначали методом Лоурі [6]. Отримані результати підлягали стандартній статистичній обробці.

Зрізи для мікроскопії готували за стандартною методикою. Зміни слизової оболонки спостерігали в зрізах, що забарвлювались гематоксиліном і еозином, з аналізом клітинного вмісту, оцінкою стану поверхневого епітелію, за наявністю і якісним складом клітин, що інфільтрують слизову оболонку шлунка.

Результати і їх обговорення. Експериментальна стресова модель ВХ у 37,5% тварин сформувала морфологічні прояви гастродуоденіту без наявних ознак виразкової хвороби, а в 62,5% випадків мала вигляд фокального некрозу, який призводить до втрати захисно-бар'єрних властивостей слизовою оболонкою, десквамації епітелію й утворення

Таблиця 1

Місцевий неспецифічний протеїназ-інгібіторний потенціал у шлунковому змиві при моделюванні стресових виразкових ушкоджень

Показник	Абсолютні значення (M ± m)		
	ЕПА, нМ/мг/хв	ТПА, нМ/мг/хв	КСІ, мІЕ/мг
Контроль	32,26 ± 5,55	30,87 ± 4,97	10,03 ± 1,98
Стрессова виразка	138,57 ± 66,23*	103,15 ± 18,67*	5,95 ± 0,76

Примітка: * – (p) відносно контрольної групи, p < 0,05.

ділянок геморагічних ерозій і виразок. Наші дослідження шлункового змиву в щурів із СВ продемонстрували зростання ТПА (табл. 1) в 3,5 рази (p < 0,05) в порівнянні з результатами контрольної групи. Спостерігалось також значне зростання ЕПА в шлункових змивах щурів зі стрессовою виразкою. Важливим було, що у випадку СВ ЕПА перевищувала контрольні показники в 4 рази (p < 0,05).

Активність КСІ була вірогідно нижчою щодо контрольних показників при стрессовому ушкодженні слизової оболонки шлунка (СОШ) на 32,5%, проте ці зміни були невірогідними. Дослідження ТПА в супернатанті СОШ визначило зниження цього показника в порівнянні із показниками контролю в моделі стресових виразково-некротичних ушкоджень слизової оболонки (табл. 2). При СВ рівень ТПА був нижчий на

48,7% від показників контролю (p < 0,05). При моделюванні виразкової поразки травного тракту стрессового генезу ЕПА зростала на 54,1% (p < 0,05) у порівнянні з контролем. Рівень КСІ поступово знижувався під дією стрессового впливу в порівнянні з показниками контрольної групи на 32,1% (p < 0,05).

Дослідження активності еластазоподібних, трипсиноподібних протеїназ та КСІ визначило, що при моделюванні стресових виразкових ушкоджень травного тракту спостерігається значне зростання ТПА в шлунковому змиві та зниження вмісту ТПА в супернатанті СОШ. Рівень ЕПА значно зростає як у шлунковому змиві, так і в супернатанті СОШ у порівнянні з контрольними значеннями, що можна розцінювати як ознаку місцевої активації протеїназ. У супернатанті СОШ

Таблиця 2

Місцевий неспецифічний протеїназ-інгібіторний потенціал у супернатанті СОШ при моделюванні стресових виразкових ушкоджень

Показник	Абсолютні значення (M ± m)		
	ЕПА, нМ/мг/хв	ТПА, нМ/мг/хв	КСІ, мІЕ/мг
Контроль	100,13 ± 14,78	26,12 ± 6,02	20,89 ± 2,54
Стрессова виразка	155,32 ± 5,97*	13,06 ± 5,11*	15,21 ± 2,11

Примітка: * – (p) відносно контрольної групи, p < 0,05.

активність еластазоподібних протеїназ зростала значно більше, ніж активність трипсиноподібних, також спостерігалось зниження активності КСІ в усіх випадках. Особливості виразкових поразок СОШ при моделюванні стрессового виразкового ушкодження підтверджувалися морфологічними дослідженнями, які визначили характерні мікроскопічні та ультраструктурні зміни.

За допомогою морфологічного дослідження слизової оболонки шлунка в щурів, яким моделювали СВ, ми макроскопічно виявили набряк слизової оболонки, поодинокі виразки, що кровоточать, та множинні ерозії шлунка, що були найбільше скупчені у фундальному відділі. У мікроскопічному дослідженні слизової оболонки фундального відділу шлунка виявляли місцеві поверхневі ерозії, які характеризувалися некрозом і десквамацією поверхневого епітелію (рис. 1), порушення кровообігу у вигляді переповнення кров'ю капілярів ворсин і судин власної оболонки та множинних периваскулярних крововиливів, значний інтерстиціальний набряк. У межах контурів дефекту були визначені дистрофічні зміни епітелію ворсин, які були представлені гідропічною дистрофією епітеліоцитів і пікнозом ядер, що були зсунуті в апікальному напрямку і набули овальної форми. Нами була визначена гіперсекреція келихоподібних клітин, що сприяють виділенню секрету, який покриває поверхню епітелію. Це можна розцінити як початкову компенсаторно-простошовну захисну реакцію на вплив шкідливого фактора. Залозистий епітелій перебував у стані підвищеної секреторної активності.

У морфологічному дослідженні слизових оболонок гастродуоденальної зони щурів, яким моделювали стрессову виразку, в

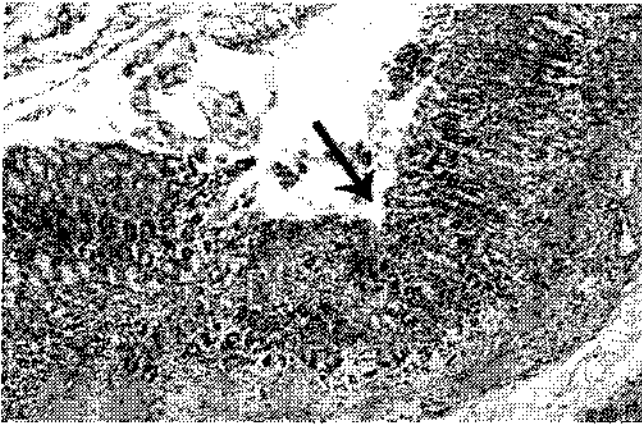


Рис. 1. Ерозія шлунка при моделюванні СВ (стрілка). Гематоксилін-еозин. 36. x200

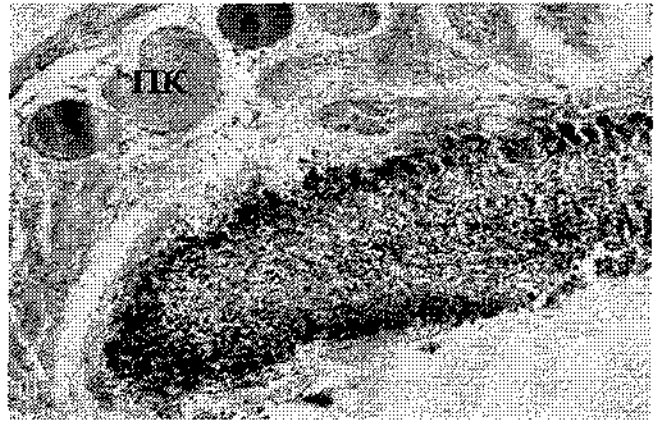


Рис. 2. Стінка шлунка при СВ (капіляри, переповнені кров'ю (ПК) і периваскулярний набряк). Гематоксилін-еозин. 36. x200

третині випадків зміни мали помірний дистрофічний характер. У більшості випадків зміни мали дистрофічний і деструктивний характер, ушкодження були поверхневими, за своєю глибиною не досягали м'язового шару (рис. 2). Так, у мікроскопічному дослідженні після моделювання стресової ситуації спостерігали помірні порушення гемодинаміки: переповнення кров'ю капілярів і периваскулярний набряк. Ворсини теж були дуже набряклими, повнокровними, спостерігалася десквамація епітеліальних клітин.

Можна визначити, що при моделюванні СВ на фоні не дуже значного підвищення еластазоподібної і трипсиноподібної активності з помірним зниженням КСІ спостерігалися множинні, але поверхневі дефекти СОШ, а в третині випадків морфологічні зміни відповідали запальним проявам гастродуоденіту.

Висновки. Отже, активація неспецифічних протеїназ і пригнічення системи їхніх інгібіторів відіграють важливу патогенетичну роль у формуванні виразкових

ушкоджень слизової оболонки шлунка і дванадцятипалої кишки. Деструктивні ушкодження СОШ супроводжуються значним порушенням активності місцевих неспецифічних протеїназ із визначеним зростанням еластазоподібної активності та пригніченням активності їхніх інгібіторів під час формування стресової виразки. Визначення протеолітичної активності та інгібіторного потенціалу може використовуватись як ознака формування деструктивних змін на ранньому етапі.

Література

1. Белоусов Ю. В. Педиатрическая гастроэнтерология: Новейший справочник / Белоусов Ю. В. – К.: ВІНФО, 2006. – 704 с.
2. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Страсбург, 18 березня 1986 року. [Збірник рішень Ради Європи: українська версія]. – К.: Парламентське видавництво, 2000. – 654 с.
3. Кубишкін А. В. Методи визначення активності неспецифічних протеїназ та їх інгібіторів у сироватці крові і біологічних рідинах / А. В. Кубишкін, В. З. Харченко, П. Ф. Семенець. – К.: Ексмед, 2010. – 28 с.
4. Скоупс Р. Методы очистки белков / Скоупс Р. [пер. с англ.]. – М.: Мир, 1985. – 358 с.
5. Руденко В. Г. Протеолитические ферменты и их ингибиторы / В. Г. Руденко, Ю. В. Руденко // Ревматология. – 2008. – № 4. – С. 42-50.
6. Филаретова Л. И. Заживление острых эрозий и хронических язв слизистой оболочки желудка у крыс / Л. И. Филаретова, Т. Р. Багаева, Т. Т. Подвигина // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2006. – № 9. – С. 1137-1146.

Стаття надійшла
24.09.2012 р.

Резюме

Экспериментальное исследование повреждений пищеварительного тракта путем моделирования иммобилизационно-холодового стресса, проведенное на 24 белых крысах-самцах линии Вистар, выявило, что рост активности местных неспецифических протеолитических ферментов (эластазо- и трипсиноподобных протеиназ) и снижение активности кислотоустойчивых ингибиторов ярко выражены при стрессовой язве. Усиление активности неспецифических протеиназ и снижение уровня их ингибиторов указывает на участие данных протеиназ и их ингибиторов в механизмах деструкции слизистой пищеварительного тракта и свидетельствует о патогенетической значимости их активации при этой патологии.

Ключевые слова: экспериментальная стрессовая язва, неспецифические протеиназы, ингибиторы неспецифических протеиназ.

Резюме

Експериментальне дослідження ушкоджень травного тракту шляхом моделювання іммобілізаційно-холодового стресу, проведене на 24 білих щурах-самцях лінії Вістар, виявило, що ріст активності місцевих неспецифічних протеолітичних ферментів (еластазо- і трипсиноподібних протеїназ) і зниження активності кислотостійких інгібіторів яскраво виражено при стресовій виразці. Посилення активності неспецифічних протеїназ і зниження рівня їхніх інгібіторів указує на участь цих протеїназ і їхніх інгібіторів у механізмах деструкції слизової оболонки травного тракту та свідчить про патогенетичну значущість їх активації при цій патології.

Ключові слова: експериментальна стресова виразка, неспецифічні протеїнази, інгібітори неспецифічних протеїназ.

Summary

The experimental research of ulcer affections of digestive tract performed by simulation of immobilization-cold stress on 24 white male Wistar-rats revealed the increase of local nonspecific proteolytic enzymes' (elastase- and trypsin-like proteinases) activity and the decrease of the acidproof inhibitor's activity. The increase of nonspecific proteinases' activity and the reduction of their inhibitors' level indicate the participation of these proteinases and their inhibitors in the mechanisms of mucous layer's destruction and is the evidence of pathogenic importance of their activation at this pathology.

Key words: experimental stress ulcer, heterospecific proteinases, inhibitors of heterospecific proteinases.