

## Рівень активності індукцибельної NO-синтази слизової оболонки періульцерозної зони при експериментальному моделюванні хронічної кровоточивої виразки

*М.В. Трофімов*

ДЗ “Дніпропетровська медична академія МОЗ України”

Лікування кровоточивих виразок гастродуоденальної зони залишається актуальною проблемою в хірургії та ендоскопії. За даними різних авторів спостерігається постійне зростання числа випадків кровоточивої виразки від 7 до 12% [1-2]. В сучасній літературі відсутня інформація про характер патоморфологічних та патофізіологічних змін в зоні кровоточивого дефекту при активній кровотечі. Провести подібне дослідження можливо тільки в експерименті, так як 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 в шлунку щурів. Враховуючи високу стабільність відтворення і значний рівень однорідності морфогенезу виразок цього типу, багато дослідників використовують різні експериментальні моделі для дослідження патфізіологічних та патоморфологічних змін в організмі дослідної тварини. Характер змін слизової оболонки свідчить про перебіг патогенетичних механізмів утворення кровоточивої виразки та сприяють пошуку найбільш ефективних методів лікування цього грізного ускладнення.

Метою роботи є визначення біохімічних особливостей обміну оксиду азоту (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 80 білих щурах-самцях популяції Вістар, масою 180–220 г. При проведенні експерименту дотримувались міжнародних рекомендацій про проведення медико-біологічних досліджень з використанням тварин згідно Європейської конвенції [3]. У дослідях на тваринах використовується багато моделей, проте одні з них надто травматичні, супроводжуються суттєвим ураженням печінки, що ускладнює інтерпретацію біохімічних показників. Використовували модель кровоточивої виразки за Такаяшу та в модифікації дослідників Національного інституту фармакології України [4]. Запропонована модель утворення кровоточивої виразки не викликає труднощів при відтворенні, тривалість загоювання виразок не менше ніж 14 днів. Тварини були розподілені на дві групи. Щурам першої групи модулювали хронічну стресову виразку шляхом хронічного іммобілізаційного стресу за методом Сел'є [5, 6, 7]. Після доби голодування експериментальних тварин іммобілізували у положенні на спині протягом 6 годин. Іммобілізацію повторювали протягом 4 діб в різні проміжки часу. При цьому відбувалось формування хронічної стресової виразки. Весь час проведення експерименту тварини перебували у голодуванні. Після означеного проміжку часу щурам вводили внутрішньочеревинно серотонін у дозі 40 мг/кг маси для формування виразкової кровотечі.

Другій групі експериментальних тварин модулювали нестероїдну виразку. Після доби голодування щурам протягом чотирьох діб проводили внутрішньошлункове введення через зонд розчин ацетилсаліцилової кислоти в дозі 20 мг/кг маси. При цьому відбувалось формування медикаментозної виразки. Весь час проведення експерименту тварини перебували у голодуванні. 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 кривизною та промивали ізотонічним розчином натрію хлориду при температурі 37 °С, 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 фарбування зрізів гемотоксілін-созіном за загальноприйнятими методиками, які дозволяють виявити м'язовий, сполучнотканинний та судинний компоненти стінки шлунка [8].

Нами проведено дослідження активності індукбельної NO-синтази (i-NOS) слизової оболонки періульцерозної зони при активній кровотечі, яке неможливо виконати в клінічних умовах. Для цього відібрана аутопсія інкубувалась при кімнатній температурі в рідині Бауена протягом 12 годин. Надалі проводили зневоднення морфологічного матеріалу, для чого відібрану слизову оболонку проводили через батарею спиртів висхідної концентрації, суміш спирту та хлороформу, хлороформ, парафінову кашу і заливали в парафін. Імунологічне забарвлення виконувалося на парафінових зрізах товщиною 3-4 мкм. Після депарафінізації та інактивації ендогенної пероксидази перекисом водню (3% р-р 30 хв) зрізи поміщали в гарячий (70-80 °С) водний розчин, що містить сліди неіоногенних детергентів «Твін-80» і «Тритон X-100» на 5-7 хвилин. Після промивки наносили первинні антитіла кролика проти індукбельної NO-синтази «Santa Cruz USA» в розведенні 1:100 на 12 годин при температурі 12 °С. Вторинні, мічені біотином, антикролячі антитіла вівці в розведенні 1:400 наносили на 15 хв. Після відмивки забуференим фізрозчином (рН 7.4) на зрізи наносили макромолекулярний комплекс стрептовідін-пероксидаза хрину (ABC Kit Elite Vectastaine, Vector Lab. Burlingame USA) в розведенні 1:400. Проявлення пероксидази хрину проводили за допомогою 3,3 діамінобензидіну тетрагідрохлориду та перекису водню. Ступінь імунопозитивності NO-синтази слизової оболонки розраховували відповідно підрахункам відсотка позитивно-забарвлених клітин в стромі слизової оболонки. Менше 2% – негативний результат (бал-0), 2-10% – незначна кількість (бал-1), 10-50% - помірна кількість позитивних клітин (бал-2), більше 50% – значна кількість імунопозитивних клітин (бал-3) [8]. Результати морфологічних досліджень консультовані завідувачем відділу патоморфології ДУ “Інститут гастроентерології НАМН України” д-р мед. наук Гайдаром Ю.А.

Статистичну обробку матеріалу проводили за допомогою стандартних комп'ютерних програм (Statistica 6.0. for Windows) [9].

Результати та їх обговорення. При дослідженні інтактних тварин товщина слизової оболонки шлунка поза складок була рівномірною. У залозах слизової оболонки добре визначались головні, парієнтальні 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 ступеню складала у першій групі (іммобілізаційна виразка) 2,2 бали, у другій (індометацинова виразка) - 3,2 бали. У першій групі виразковий індекс складав 0,978 балів, а в другій - 0,968 балів.

При мікроскопічному дослідженні встановлений набряк клітин покривного епітелію у перифокальній зоні формування виразки. Епітеліоцити мали великі розміри, що може бути пов'язане з набряком самих клітин. Спостерігаються явища апоптозу клітин – відзначаються гіперхромні ядра та цитоплазма з гідропічною слизовою дистрофією. На рівні між'ямкових валиків спостерігається виражена поліморфно-клітинна інфільтрація з перевагою лімфоїдних елементів. У залозистому епітелії спостерігається значна кількість міжепітеліальних лімфоцитів, що розміщені на базальній мембрані епітелію. Під поверхневим епітелієм по всій товщі слизової оболонки спостерігається помірний набряк та виражена інфільтрація лейкоцитами, що свідчить про різке підвищення проникненості 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 діапедезні крововиливи. Поряд з цим спостерігається переважання кількості міжепітеліальних лімфоцитів, розміщених в базальній частині плазматичних клітин, наявність множинних лімфатичних фолікулів (рис. 1, рис. 2).

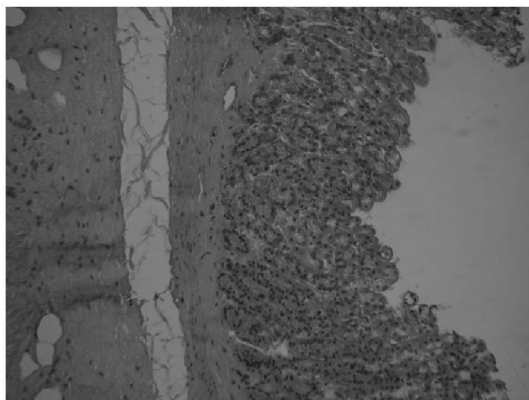


Рисунок 1 – Забарвлення гематоксилин-еозином. Зона виразкового дефекту. Дистрофічні зміни, апоптоз клітин. Дифузний еритродіapedез. Поліморфно-клітинна інфільтрація на рівні ямок та шийок залоз. 1x250.



Рисунок 2 – Специфічне імуногістохімічне забарвлення. Виражена дилатація судин періульцерозної зони. Виражена активність i-NOS гладенької мускулатури судин стінки шлунка. 2x250.

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

Аналізуючи дані імуногістохімічного дослідження активності i-NOS слизової оболонки періульцерозної зони в групі тварин як

з стресовим впливом так і з медикаментозним моделюванням виразкової кровотечі спостерігається виражена її активність у пограничній з виразкою ділянці (рис. 3, 4).

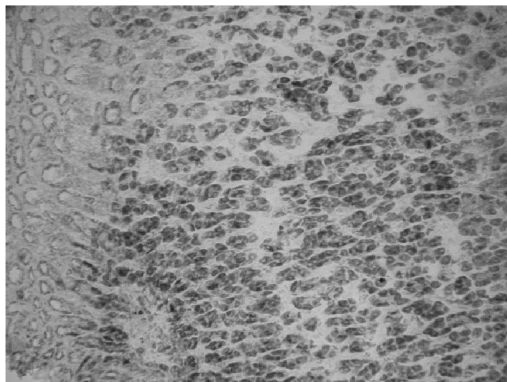


Рисунок 3 - Специфічне імуногістохімічне забарвлення. Погранична ділянка слизової оболонки до виразкового дефекту при стресовому моделюванні кровоточивої виразки. Виражена активність i-NOS. Більше 50% імунопозитивних клітин в полі зору. 2x250.

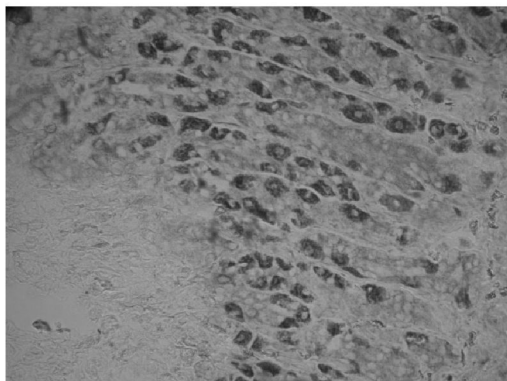


Рисунок 4 - Специфічне імуногістохімічне забарвлення. Зона виразкового ураження. Вплив ацетилсаліцилової кислоти. Відсутність активності i-NOS в зоні виразкового ураження при збереженні вираженої активності в пограничній до виразкового дефекту зоні. 2x200.

Виявлена виражена активність i-NOS в міозитах м'язової пластини слизової оболонки шлунка та гладенької мускулатури судин стінки шлунка, що призводить до їх вираженої дилатації. Цей факт можна пояснити вираженою лейкоцитарною інфільтрацією періульцерозної зони з переважанням лімфоцитарної ланки - i-NOS входить до циклооксигеназного механізму та активується цитокінами лімфоцитів. Підвищення активності i-NOS призводить до збільшення продукції оксиду азоту з амінокислоти L-аргініну.

При збільшенні продукції NO спостерігається виражена вазодилатація, блокування вазоконстрикції, пригнічення тромбоутворення. Ці зміни можуть сприяти розвитку кровотечі.

При моделюванні хронічної 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.

**Висновки.**

Запропонована модель відтворення хронічної кровоточивої виразки є адекватною моделлю виникнення кровоточивої виразки у людини, не викликає труднощів в постановці експерименту та надає можливість дослідити зміни, які неможливо дослідити в клінічних умовах.

Зростання кількості міжепітеліальних лімфоцитів на тлі лейкоцитарної інфільтрації з формуванням множинних вогнищ лімфатичних фолікулів підтверджує наявність асептичного запалення в періульцерозній ділянці слизової оболонки шлунку при хронічній кровоточивій виразці.

При хронічній кровоточивій виразці в слизовій оболонці періульцерозної зони спостерігається виражена активність індукцйбельної NO-синтази наслідком чого є дилатація артеріол, розширення просвіту гемокапілярів, венул, локальне повнокров'я, множинні діapedезні крововиливи, що може сприяти подальшому розвитку кровотечі.

1. Тактика и результаты хирургического лечения гастродуоденальных язв, осложнённых острым кровотечением, в специализированном центре желудочно-кишечных кровотечений / *Е.Н. Шепетько, П.Д. Фомин, А.В. Заплавский [и др.]* // *Клінічна хірургія*. – 2007. – №5-6. – С. 88.
2. *Никишаев В.И.* Экспериментальное исследование эффективности различных методов эндоскопического гемостаза. / *В.И. Никишаев, С.Г. Гичка, В.В. Бойко* // *Український журнал малоінвазивної та ендоскопічної хірургії*. – 2005. – №1-2. – С. 6–11.
3. Рекомендації II національного конгресу України з біоетики (Київ, 29 вересня – 2 жовтня 2004 р.) // *Журнал АМН України*. – 2004. – Т.10, № 4. – С. 827–829.
4. *Стефанов А.В.* Оценка специфической фармакологической активности лекарственных средств / *А.В. Стефанов*. – Киев: Авиценна, 2002. – 567 с.
5. *Василишин Р.Й.* Морфологічні показники регенеративних процесів виразкового дефекту у слизовій оболонці шлунка щурів / *Р.Й. Василишин, М.Б. Щербинина, В.Д. Мішалов* // *Вісник проблем біології та медицини*. – 2002. – №2. – С. 50–54.
6. Модель ерозивно-виразкового ураження гастродуоденальної зони / *І.Ф. Мецинен, І.М. Яремій, О.І. Волошин, Н.П. Григор'єва* / *Експериментальна фізіологія та біологія*. – 2004. – №2. – С. 27–29.
7. *Подзорова А.В.* Методы экспериментального моделирования язв в разных отделах желудочно-кишечного тракта / *А.В. Подзорова* // *Вісник проблем біології та медицини*. – 1999. – №2. – С. 48–52.
8. *Аруин Л.И.* Морфологическая диагностика заболеваний желудка и кишечника / *Л.И. Аруин, Л.Л. Капуллер, В.А. Исаков*. – М.: Триада, 1998. – 483 с.
9. *Иванов Ю.И.* Статистическая обработка результатов медико-биологических исследований на микрокалькуляторах и по программам / *Ю.И. Иванов, О.Н. Погорелюк*. – М.: Медицина, 1996. – 221 с.



## LEVEL I-NOS ACTIVITY'S OF PERIULCEROSIS AREA AT THE EXPERIMENTAL MODEL OF CHRONICLE BLEEDING ULCER

N.V. Trofimov

GU "Dnepropetrovsk medical academy of MZ of Ukraine"

The morphological analysis of pathomorphological processes in the mucous membrane of stomach in rats with an experimental ulcer for Takayashu is conducted. Histochemical research of the i-NOS activity is produced in a periulcerosis area mucous. In the mucous membrane of periulcerosis area is observed the phenomena of apoptosis cells, severe leucocitaris infiltration, dilatation of arterioles, capillaries and venules, diapedesis bleedings. Set the sharp increase of the i-NOS activity in the periulcerosis area of mucous and phenomena of increase of permeability of vessels. The reveled signs can be used in the further research of effective methods of treatment and prognosis of the gastroduodenal bleeding.

УДК 616.37-002.2:616.12-005.4]-085:577.115

## Пероксидація ліпідів при хронічному панкреатиті за супутньої ішемічної хвороби серця у динаміці лікування

*О.І. Федів, Д.О. Гонцарюк, Т.М. Христич, Я.М. Телекі, О.Ю. Оліник*  
Буковинський державний медичний університет (Чернівці)

Відомо, що патогенез як хронічного панкреатиту, так і атеросклерозу, ішемічної хвороби серця (ІХС) і, навіть серцевої недостатності, її стадія і функціональний клас залежать від генотипу конкретної особистості та впливу на неї факторів зовнішнього середовища. Доведено, що одним з перших бар'єрів на шляху реалізації впливу несприятливих факторів зовнішнього середовища є ендотелій [1, 2]. Впливаючі фактори ризику