

УДК 616.33-002.44:616-008.63:616-018

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

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

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

ДОСЛІДЖЕННЯ ЕКСТРАПІНЕАЛЬНОГО ДЖЕРЕЛА СИНТЕЗУ МЕЛАТОНІНУ У ЩУРІВ-САМЦІВ З ВИРАЗКОВИМ УРАЖЕННЯМ ШЛУНКА НА ТЛІ ДЕСИНХРОНОЗУ

Досліджено мелатонін-позитивно-мічені клітини слизової оболонки шлунка з виразковим ураженням на тлі десинхронозу у щурів-самців віком 9, 15 та 20 міс, що відповідає віку людини 29–30, 43–44 та 55–56 років. Визначено достовірне зниження загальної кількості мелатонін-позитивно-мічених клітин у щурів-самців з виразковим ураженням шлунка на тлі десинхронозу порівняно з показником тварин інтактного контролю та щурів з десинхронозом усіх вікових груп. Встановлено наявність різних типів клітин, відмінних за морфологічною будовою, що дозволяє припустити можливість різної їх функції в нормі та в захисті слизової оболонки шлунка при пошкодженнях різної етіології. Найбільші структурно-морфологічні зміни визначено у тварин віком 9 та 15 міс з виразковим ураженням на тлі десинхронозу, що може бути підґрунтям високої захворюваності на виразкову хворобу у чоловіків у віці 20–45 років.

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

Основним джерелом синтезу мелатоніну є епіфіз, де він утворюється із амінокислоти триптофан під контролем супрахізматичних ядер гіпоталамуса залежно від інтенсивності сигналу від фоторецепторів сітківки ока [1]. Однак окрім епіфіза синтез мелатоніну відбувається і в так званих екстрапінеальних джерелах – сітківці ока, плаценті, тучних клітинах, тканинах легень та ін. [2, 3]. При цьому в шлунково-кишковому тракті (ШКТ) його утворюється в 400 разів більше, ніж в інших джерелах. Місцем синтезу мелатоніну в ШКТ є ентерохромафінні клітини, які широко представлені в слизовій оболонці шлунка (СОШ) [4, 5]. Порушення сну, яке на сьогодні в популяції досягає 80–95 %, призводить до неадекватності фізіологічних біоритмів секреції епіфізарного мелатоніну та розвитку десинхронозу [6]. Доведено, що десинхроноз є причиною зміни будови тканин організму та розвитку захворювань внутрішніх органів [7–9].

Одним із таких захворювань, у патогенезі якого важливу роль відіграє дефіцит мелато-

ніну, є виразкова хвороба [10, 11], високу захворюваність на яку відмічають у чоловіків переважно молодого віку [12]. При цьому відомості щодо досліджень морфофункціонального стану ентерохромафінних клітин, які продукують мелатонін, так звані мелатонін-продукуючі, або мелатонін-позитивно-мічені клітини, з виразковим ураженням шлунка на тлі десинхронозу у тварин або людей різного віку в сучасній доступній літературі відсутні.

У зв'язку з цим метою нашого дослідження було вивчення мелатонін-позитивно-мічених клітин СОШ у щурів-самців різного віку з виразковим ураженням шлунка на тлі десинхронозу.

Матеріал і методи. Робота виконана на 688 зрізах слизової оболонки пілоричного відділу шлунка щурів-самців віком 9, 15 та 20 міс, що відповідає віку людини 29–30, 43–44 та 55–56 років. Зразки отримано від тварин, які були розподілені на дев'ять груп: 1-ша–3-тя – інтактний контроль – самці у віці 9, 15 та 20 міс відповідно; 4–6-та – самці відповідного віку з десинхронозом; 7-ма–9-та –

© В.В. Гнатюк, Н.М. Кононенко, Г.А. Божок, 2016

самці відповідного віку з виразковим ураженням шлунка на тлі десинхронозу. Тварини 1–3-ї груп знаходилися в умовах природного освітлення з вільним доступом до води та їжі. Тварин 4–6-ї груп утримували протягом 14 днів в умовах цілодобового освітлення з вільним доступом до їжі та води – у стані десинхронозу [13]. Тваринам 7–9-ї груп після 14 днів цілодобового освітлення на 15-ту добу досліду моделювали виразки шлунка методом спирто-преднізолонового ушкодження: внутрішньошлунково вводили преднізолон у дозі 20 мг/кг, що був розчинений у 80 % етиловому спирті в дозі 6 мл/кг [14]. Забір зразків з пілоричного відділу СОШ у тварин 1–6-ї груп проводили на 15-ту добу від початку експерименту, у тварин 7–9-ї груп – на 3-тю добу після моделювання виразкового ушкодження (на 18-ту добу експерименту). Слизову оболонку шлунка досліджували методом імуногістохімічного забарвлення з первинними антитілами до мелатоніну (Biorbyt, Великобританія) та вторинними Alexa Fluor 488 кон'югованими антитілами (Abscam, Великобританія). Ядра були забарвлені пропідію йодидом (Sigma, США). Флюоресценцію спостерігали на флюоресцентному мікроскопі Olympus IX-71 (Японія) при довжині хвилі для Alexa Fluor 488 – 519 нм, для пропідію йодиду – 617 нм. Клітини у зразках підраховували при збільшенні: окуляр 10, об'єктив 40. Аналіз серійних зрізів виконували за допомогою програми для аналізу й обробки зображення 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 оцінювали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу, достовірними вважали різницю при $p < 0,05$ [15]. Використовували програмне забезпечення «Statistica 7.0» та Excel.

Результати дослідження. Загальна кількість мелатонін-позитивно-мічених клітин (МПК) у щурів-самців з виразковим ураженням шлунка на тлі десинхронозу достовірно ($p \leq 0,05$) нижча, ніж у групах інтактного контролю та груп з десинхронозом усіх вікових категорій (таблиця). Так, при десинхронозі загальна кількість МПК знижується у самців віком 9 міс на 30 %, у самців віком 15 міс – на 36 %, у самців віком 20 міс – на 27 % ($p \leq 0,05$). На тлі виразкового ураження шлунка кількість МПК відносно контролю відповідного віку знижується у 2,6; 2,7 і 0,7 рази ($p \leq 0,05$). Відносно показника тварин з десинхронозом у тварин відповідного віку з виразковим ураженням на тлі десинхронозу зниження було на 45; 43 та 8 % ($p \leq 0,05$).

При аналізі морфологічної картини встановлено, що в зразках інтактних тварин МПК представлені трьома типами клітин: 1-й – дрібні клітини діаметром 3,8–7,6 мкм, що знаходяться переважно в базальному відділі шлункової залози, 2-й – великі клітини діаметром від 11 до 17 мкм без гранул у цитоплазмі та 3-й – великі клітини з гранулами в цитоплазмі, які займають базальний і середній відділи залози. При цьому в зразках усіх тварин представлені всі види клітин з переважанням клітин 1-го та 2-го типів, за

Загальна кількість МПК у СОШ щурів-самців різного віку з виразковим ураженням шлунка на тлі десинхронозу

Умова експерименту	Вік, міс		
	9	15	20
Інтактний контроль	720,8±40,5 n=76	856,3±45,2 n=69	507,6±30,0 n=83
Десинхроноз	508,1±47,3* n=64	50,2±32,2* n=106	368,2±25,1* n=56
Виразкове ураження на тлі десинхронозу	278,8±21,1*# n=44	314,9±33,3*# n=28	339,2±31,5*# n=58

Примітки: 1. $p \leq 0,05$; різниця достовірна при порівнянні з показником: * інтактного контролю; # щурів з десинхронозом.

2. n – кількість зразків, у яких підраховували МПК.

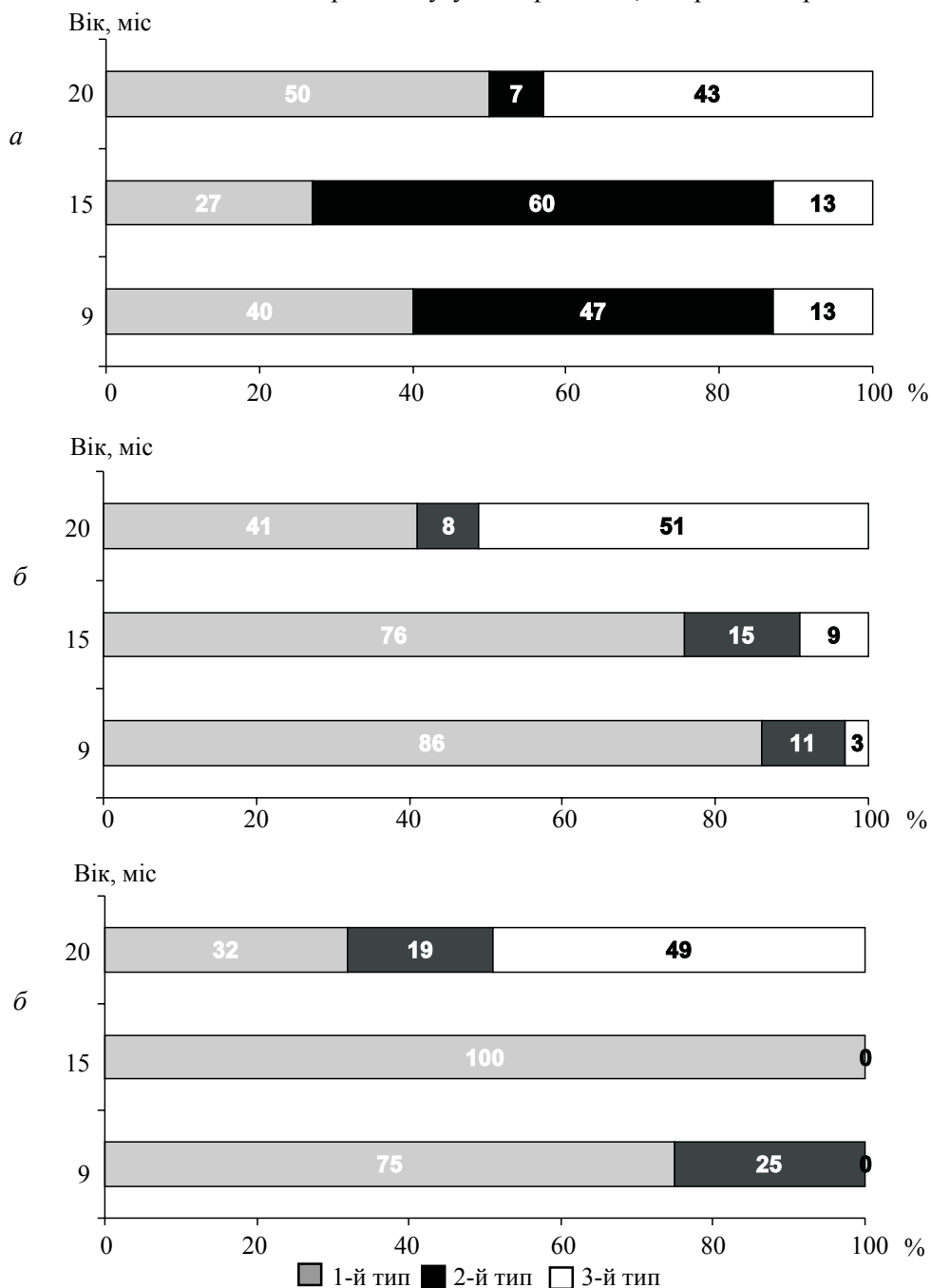
винятком самців віком 20 міс, у яких спостерігались переважно 1-й та 3-й типи МПМК (рисунок, *a*).

На тлі десинхронозу відбувається перерозподіл клітин (рисунок, *б*).

У зразках щурів віком 9 і 15 міс збільшується кількість клітин 1-го типу на 46 і 49 % відповідно і знижується кількість клітин 3-го типу на 10 та 4 % відповідно. При цьому у

щурів 20 міс, навпаки, кількість клітин 1-го типу знижується на 9 %, а 3-го типу – збільшується на 8 %.

Мелатонін-позитивно-мічені клітини у СОШ у тварин з виразковим ураженням на тлі десинхронозу вивчали у 130 зразках із 234. У 104 зразках підрахунок здійснити було неможливо у зв'язку з наявним запальним процесом, набряком ворсин та деструктив-



Співвідношення різних типів МПМК у щурів-самців різного віку в нормі (*a*), із десинхронозом (*б*) та з виразковим ураженням на тлі десинхронозу (*в*)

ними змінами, що спостерігалися. При вивченні співвідношення клітин у досліджених зразках встановлено, що у самців віком 9 та 15 міс клітини 3-го типу відсутні, а переважають клітини 1-го типу – 75 і 100 % відповідно. У самців віком 20 міс відбулося зниження кількості клітин 1-го типу на 9 % відносно показника у тварин з десинхронозом та на 18 % відносно інтактного контролю, при цьому кількість МПМК 3-го типу збільшилась на 6 % відносно інтактного контролю, але зменшилась на 2 % відносно такої у щурів з десинхронозом.

Обговорення результатів дослідження.

Мелатонін-позитивно-мічені клітини СОШ вважають одним із головних джерел екстрапінеального мелатоніну [2]. Зниження загальної кількості МПМК у тварин з десинхронозом усіх вікових груп свідчить про вплив пінеального мелатоніну, дефіцит якого має місце в організмі в цьому випадку, на проліферативні процеси в організмі, а саме в СОШ. При виразковому процесі відбувається достовірне зниження кількості МПМК як унаслідок порушення центральних механізмів регуляції, так і через деструктивні процеси, що відбуваються в СОШ.

Наявність клітин, відмінних за морфологічною будовою, свідчить про можливість різної їх функції в нормі та в захисті СОШ при пошкодженнях різної етіології [16]. Так, збільшення кількості МПМК 3-го типу у щурів віком 20 міс у групі інтактного контролю та при десинхронозі дозволяє припустити, що утворення цих клітин є реакцією на зниження рівня загального мелатоніну в сироватці крові, що спостерігається при віковій інволюції епіфіза та десинхронозі [1, 2, 6].

При цьому на тлі десинхронозу у молодих і зрілих самців клітини цього типу в зразках відсутні, що, вірогідно, пов'язано з екзокринним та інтерстиціальним викидом мелатоніну із клітин 3-го типу для реалізації захисних механізмів СОШ та периферичних нейрогормональних взаємозв'язків [16]. А збільшення кількості клітин 1-го та 2-го типів у щурів 9 та 15 міс є проявом процесів, що відбуваються як результат функціонального напруження на систему МПМК у СОШ. Визначені нами значні зміни в кількості МПМК та у співвідношенні різних типів у тварин 9 та 15 міс з виразковим ураженням на тлі десинхронозу свідчать про наявні структурно-морфологічні зміни, що відбуваються в СОШ, та можуть бути підґрунтям високої захворюваності на виразкову хворобу у чоловіків у віці 20–45 років [12].

Висновки

1. Виразкове ураження слизової оболонки шлунка на тлі десинхронозу призводить до достовірного зниження кількості мелатонін-позитивно-мічених клітин у щурів-самців усіх вікових груп.

2. Структурно-морфологічні зміни мелатонін-позитивно-мічених клітин, що спостерігаються у щурів віком 9 та 15 міс, дозволяють віднести чоловіків віком 20–45 років до групи ризику з виразкової хвороби.

Перспективи досліджень. У подальшому планується вивчення взаємозв'язку між кількістю мелатонін-позитивно-мічених клітин та рівнем мелатоніну в крові.

Список літератури

1. Suprachiasmatic control of melatonin in rats: inhibitory and stimulatory mechanisms / S. Perreault, A. Kalsbeek, M. L. Garidou [et al.] // *Eur. J. Neurosci.* – 2003. – V. 17. – P. 221–228.
2. Мелатонин: теория и практика / [под ред. С. И. Рапопорт, В. А. Голиченкова]. – М. : ИД «Медпрактика-М», 2009. – 99 с.
3. Gastrointestinal melatonin: cellular identification and biological role / I. G. Kvetnoy, I. E. Ingel, T. V. Kvetnaia [et al.] // *Neuroendocrinology Letters.* – 2002. – V. 23. – P. 121–132.
4. Bubenik G. A. Gastrointestinal melatonin: localization, function and clinical relevance / G. A. Bubenik // *Digestive Diseases and Sciences.* – 2002. – V. 47, № 10. – P. 2336–2348.
5. Konturek S. J. Melatonin in gastroprotection against stress-induced acute gastric lesions and healing of chronic gastric ulcers / S. J. Konturek, P. C. Konturek, T. Brzozowski // *J. of Physiology and Pharmacology.* – 2006. – V. 57, supp. 5. – P. 51–66.
6. Rodriguez J. C. Sleep problems in the elderly / J. C. Rodriguez, J. M. Dzierzewski, C. A. Aleesi // *Med. Clin. North. Am.* – 2015. – V. 99, is. 2. – P. 431–439.
7. Костенко Е. В. Десинхроноз как один из важнейших факторов возникновения и развития цереброваскулярных заболеваний / Е. В. Костенко, Т. М. Малевич, Н. А. Разумов // *Лечебное дело.* – 2013. – № 2. – С. 104–116.

8. Князькин И. В. Пинеальная железа и экстрапинеальные источники мелатонина в висцеральных органах при естественном старении человека / И. В. Князькин // Успехи герантологии. – 2008. – Т. 21, № 1. – С. 83–85.
9. Melatonin and its correlation with testosterone in polycystic ovarian syndrome / P. Jain, M. Jain, S. Haldar [et al.] // Journal of Human Reproductive Sciences. – 2013. – V. 6, № 4. – P. 253–258.
10. Мелатонин и заболевания желудочно-кишечного тракта / А. А. Опарин, О. Е. Шаповалова, Ю. И. Двошкина, Н. В. Лаврова // Международный медицинский журнал. – 2010. – № 4. – С. 68–72.
11. Опарин А. А. Роль нарушений мелатонинового метаболизма в развитии язвенной болезни двенадцатиперстной кишки в сочетании с хронической бронхолегочной патологией / А. А. Опарин, А. Е. Новохатняя // Вісник проблем біології і медицини. – 2009. – Вип. 1. – С. 15–20.
12. Исламова Е. А. Возрастные особенности язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки / Е. А. Исламова // Саратов. науч.-мед. журн. – 2009. – Т. 5, № 4. – С. 569–571.
13. Влияние экспериментального десинхроноза на органы иммунной системы у крыс WAG и НИСАГ / А. В. Шурлыгина, Е. В. Мельникова, Н. Г. Пантелеева [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 155, № 5. – С. 611–615.
14. Стефанов О. В. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рекомендації / О. В. Стефанов. – К. : Видавничий дім «Авіцена», 2001. – 323 с.
15. 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.
16. Руководство по гистологии : в 2 т. / под ред. Р. К. Данилова. – [Изд-во 2-е, испр. и доп.]. – СПб. : СпецЛит, 2011. – Т. 2. – С. 186–203.

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

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСТРАПИНЕАЛЬНОГО ИСТОЧНИКА СИНТЕЗА МЕЛАТОНИНА У КРЫС-САМЦОВ С ЯЗВЕННЫМ ПОРАЖЕНИЕМ ЖЕЛУДКА НА ФОНЕ ДЕСИНХРОНОЗА

Исследованы мелатонин-положительно-меченные клетки слизистой оболочки желудка с язвенным поражением на фоне десинхроноза у крыс-самцов в возрасте 9, 15 и 20 мес, что соответствует возрасту человека 29–30, 43–44 и 55–56 лет. Определено достоверное снижение общего количества мелатонин-положительно-меченных клеток у крыс-самцов с язвенным поражением желудка на фоне десинхроноза в сравнении с показателем животных интактного контроля и крыс с десинхронозом во всех возрастных группах. Установлено наличие различных типов клеток, различающихся по морфологическому строению, что позволяет предположить возможность различных их функций в норме и при защите слизистой оболочки желудка при повреждениях разной этиологии. Наибольшие структурно-морфологические изменения определены у животных в возрасте 9 и 15 мес с язвенным поражением на фоне десинхроноза, что может быть основой для высокой заболеваемости язвенной болезнью у мужчин в возрасте 20–45 лет.

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

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

THE STUDY OF EXTRAPINEAL SOURCE OF MELATONIN SYNTHESIS IN MALE RATS WITH GASTRIC ULCER IN DESYNCHRONOSIS

Melatonin-positive-labeled cells of the gastric mucosa with ulcerative lesions in desynchronosis was studied in male rats at the age of 9, 15 and 20 months that corresponds to the age of the person 29–30, 43–44 and 55–56 years. A significant decrease in the total number of melatonin-positive-labeled cells in male rats with ulcerative lesions of the stomach in desynchronosis was found compared to the intact control and the rats in desynchronosis all ages. The presence of different types of cells that differ in morphological structure, that suggests the existence of a variety of functions in health and protection of the gastric mucosa with injuries of different etiology. The most structural and morphological changes determined in animals with ulcerative lesions in desynchronosis ages 9 and 15 months that can be the basis for the high incidence of peptic ulcer disease on men aged 20–45 years.

Keywords: desynchronosis, gastric ulcer, sex, age.

Поступила 05.02.16