

Российская академия наук
Геронтологическое общество
Северо-Западное отделение Российской академии
медицинских наук
НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова
Петрозаводский государственный университет
Институт биологии Карельского НЦ РАН
Министерство здравоохранения и социального развития
Республики Карелия

СВЕТОВОЙ РЕЖИМ, СТАРЕНИЕ И РАК

Сборник научных трудов
II Российского симпозиума с международным
участием

Петрозаводск
2013

ВЛИЯНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО ПОСТОЯННОГО ОСВЕЩЕНИЯ НА СЛИЗИСТУЮ ОБОЛОЧКУ ЖЕЛУДКА

Губина-Вакулик Г.И.¹, Миловидова А.Э.², Колоусова Н.Г.¹

¹*Харьковский национальный медицинский университет, Харьков, Украина,*

²*ГУ «Институт общей и неотложной хирургии НАМН Украины», Харьков, Украина*

ey70@mail.ru

У людей с язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки снижается качество жизни, а осложнения могут привести к летальному исходу. В Норвегии отмечено, что случаи с перфорацией пептической язвы наблюдаются с примерно одинаковой частотой в течение изученного десятилетнего периода, а именно 6,5 случая на 100000 населения в год, смертность составила 1,1 случая на 100000 населения в год. А разница по возрасту наблюдаемых больных очень существенна: у больных старше 60 лет частота инцидента перфорации пептической язвы выше, чем у молодых более чем в 10 раз, а смертность – более, чем в 50 раз, причем два из трех случаев происходили ночью (Thorsen et al., 2013). Последнее позволяет предположить, что световой режим важен для течения хронического гастрита, пептической язвы и ее осложнений. По данным другого исследователя, у людей с пептической язвой и гастроэзофагальным рефлюксом с симптомами эпигастралгии и ретростеральной боли кислотность желудочного содержимого во второй половине ночи оказалась повышенной, а утром симптомы исчезали, кислотность уменьшалась (Saitoh et al., 2001).

Несмотря на многочисленные исследования, посвященные проблеме язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, отсутствие экспериментальной модели, близкой по патофизиологии к язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, не позволяет изучить механизм, в т.ч.

морфогенез, на начальных стадиях нарушения процессов регенерации.

Лаборатория хронобиологии ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им. В. Я. Данилевского НАМН Украины» (г. Харьков) много лет занимается изучением гормональных последствий постоянного освещения. С любезного разрешения заведующей лаборатории – доктора биологических наук Бондаренко Л.А., мы воспользовались материалом, полученным при постановке эксперимента с содержанием животных в условиях длительного постоянного освещения. По результатам действия постоянного освещения на эндокринную систему, на сердечно-сосудистую систему животных сотрудники лаборатории сделали заключение об ускорении старения животных (Бондаренко и соавт., 2009).

Цель настоящего исследования – выяснить микроскопические особенности слизистой оболочки желудка кроликов, пребывавших в условиях постоянного освещения в течение 5 месяцев, и оценить действие курса инъекций мелатонина на выраженность морфогенетических признаков формирующегося гастрита.

Материал и методы исследования. В эксперименте использовано 14 кроликов породы Шиншилла в возрасте 4-5 месяцев, самцы. Эксперимент продолжался 5 месяцев, с февраля по июль. Четыре особи представили контрольную группу, их содержали в условиях естественного светового режима. Постоянное освещение в течение 5 месяцев осуществляли следующим образом: в светлое время суток – естественное освещение, в темное время – искусственное освещение обычной бытовой лампой с уровнем освещенности внутри клетки 30-40 люкс (5 особей). Животные третьей группы также в течение 5 месяцев находились в условиях постоянного освещения, после завершения действия постоянного освещения этим животным в течение 10 дней в конце световой фазы инъекционно внутримышечно вводили водный раствор мелатонина (5 особей) в дозе 2,5 мг/кг (Sigma, США).

Выведение животных из эксперимента проводили под наркозом (тиопентал натрия) согласно условиям эвтаназии,

указанным в методических рекомендациях МЗ Украины, и общим этическим принципам проведения экспериментов на животных согласно положениям «Европейской конвенции о защите позвоночных, которых использовали для экспериментальных и иных целей» (Резніков, 2003).

Из участка слизистой оболочки желудка (тело желудка близко к антральному отделу по задней стенке) приготовили микропрепараты, окрашенные пикрофуксином по Ван Гизону, галлоцианином по Эйнарсону на суммарные нуклеиновые кислоты, поставлена ШИК-реакция. Уровень пролиферативной активности эпителия слизистой оболочки желудка определили, используя иммуногистохимическую реакцию с кроличьими антителами Ki-67 (Novocastra Laboratories Ltd.), люминесцентная визуализация проведена путем последующей обработки микропрепаратов антителами морской свинки против IgG кролика, мечеными ФИТЦ (Москва, РФ). Микроскопирование гистологических препаратов осуществляли на микроскопе Axiostar-plus (Zeiss, Германия), а иммуногистохимических – на микроскопе Axioscop-40 (Zeiss, Германия). На компьютерных изображениях слизистой оболочки желудка определены размеры париетальных клеток и их ядер, а также оптическая плотность цитоплазмы главных клеток при окраске микропрепаратов галлоцианином по Эйнарсону, которая является гистохимической окраской на суммарные нуклеиновые кислоты, т.е. позволяет оценить содержание РНК в цитоплазме.

После доказательства нормального распределения цифровых значений изучаемых показателей осуществлен вариационный анализ с определением уровня значимости различия в двух группах с использованием критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение. Слизистая оболочка желудка у кроликов складчатая, представлена желудочными ямками и железами. Желудочные железы ровные, содержат умеренное количество париетальных клеток округло-овальной формы, с эозинофильной зернистой цитоплазмой. Главные клетки имеют ядро в базальной части, апикальная часть клеток не повреждена. Собственная пластинка слизистой оболочки

желудка тонкая, с небольшим количеством редко расположенных фиброцитов.

Складчатость слизистой оболочки желудка в группе, подверженных постоянному освещению, менее выражена, толщина слизистой оболочки желудка меньше, чем в контрольной группе. Местами поверхностные слои слизистой оболочки желудка имеют дефекты. Ямки и железы размещены реже, чем в контроле. Строма слизистой оболочки желудка обогащена макрофагами и лимфоцитами, содержит увеличенное количество коллагена. Оказалось, что у кроликов в группе постоянного освещения наблюдается рыхлое расположение эпителиоцитов в желудочных железах. Parietalные клетки часто имеют вытянутую форму и два ядра. Ядра париетальных клеток крупнее, чем у животных при нормальной смене дня и ночи, а площадь цитоплазмы меньше, что свидетельствует о более активном синтезе и выведении веществ, без накопления (таблица). Цитоплазма главных клеток имеет достоверно меньшую оптическую плотность при окраске галлоцианином (на 20%), что свидетельствует об уменьшении содержания РНК.

Используя иммуногистохимическую методику, удалось доказать, что у животных группы, подверженных постоянному освещению, имеется значительное снижение пролиферативной активности эпителиоцитов слизистой оболочки желудка. Если у животных контрольной группы зона перешейка желудочных желез имеет множество меченых эпителиальных клеток, то в группе постоянного освещения зона с пролиферирующими эпителиоцитами выглядит заметно уже, а расположение меченых клеток в зоне перешейка редкое.

Таблица.

Морфометрические показатели клеток слизистой оболочки
желудка кроликов

Опытные группы животных	Средняя площадь париетальных клеток (мкм ²)	Средняя площадь ядра париетальных клеток (мкм ²)	Средняя площадь цитоплазмы париетальных клеток (мкм ²)	Оптическая плотность цитоплазмы главных клеток при окраске галлоцианином (усл. ед. опт. пл.)
Контрольная группа животных (Гр.К)	226,12±3,34	17,72±0,42	208,39±7,27	0,559±0,004
Группа животных в условиях постоянного освещения (Гр.ПО)	158,00±10,63	20,03±1,12	138±10,69	0,406±0,015
Группа животных в условиях постоянного освещения с последующим введением мелатонина (Гр.ПО+М)	176,63±3,93	22,74±1,01	153,78±0,88	0,474±0,028

Примечание. Достоверность отличий между группами:

Гр.К-Гр.ПО

Гр.К- p<0,001 0,01<p<0,02 p<0,001 p<0,001

Гр.ПО+М p<0,001 p<0,05 p<0,001 p<0,01

Гр.ПО- 0,02<p<0,05 p<0,001 p<0,001 0,02<p<0,05

Гр.ПО+М

Таким образом, длительное (5 месяцев) содержание кроликов в условиях постоянного освещения приводит к развитию хронического гастрита с эрозиями на фоне недостаточной пролиферативной активности эпителиоцитов слизистой оболочки желудка и наличия признаков ее атрофизации. Можно говорить о новой экспериментальной модели хронического гастрита с эрозиями. Ранее сообщалось, что у пожилых больных с хроническим гастритом в слизистой оболочке желудка наблюдали снижение индекса пролиферации и повышение индекса апоптоза эпителиальных клеток (Шимчук, 2005).

Т.е. исследуемые экспериментальные условия, а именно – постоянное освещение – обуславливают формирование патогенетически важнейшего момента, ведущего к появлению дефекта слизистой оболочки, – снижение пролиферативной активности эпителия. В результате чего происходит медленная атрофизация слизистой оболочки желудка с появлением ее дефектов.

Курс инъекций мелатонина после 5 месяцев содержания животных в условиях постоянного освещения привел к повышению пролиферативной активности эпителия желудочных желез, что выглядит местами как расширение зоны, где расположены меченые клетки, а местами как увеличение плотности расположения меченых клеток (иммуногистохимическая реакция к антигену Ki-67). Обнаружены морфометрические признаки увеличения морфофункциональной активности париетальных клеток (таблица). Главные клетки ответили увеличением содержания РНК в цитоплазме (таблица). Т.е. курс инъекций мелатонина улучшил морфофункциональное состояние слизистой оболочки желудка, имевшей микроскопические признаки хронического гастрита с эрозиями.

В клинических работах, посвященных лечебному эффекту экзогенного мелатонина при хроническом гастрите и язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки (Ganguly et. al., 2012; Осадчук и соавт., 2012; Саватеева-Любимова и соавт., 2012), также обнаружено наличие микроскопических и биохимических

признаков улучшения морфофункционального состояния слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки.

Механизм развития наблюдаемых нами изменений слизистой оболочки желудка при длительном постоянном освещении животных не известен. Однако, если рассмотреть состояние pineальной железы мозга в том же эксперименте в динамике, т.е. через 1, 2, 3, 4 и 5 месяцев, то, очевидно, что под действием постоянного освещения в первые 1-2 месяца через pineальную железу мозга происходит адекватная дневному периоду суток морфофункциональная стимуляция многих эндокринных желез и органов, а в сроке 4-5 месяцев период интенсивного развития, пролиферации сменяется на период атрофизации (Бондаренко, 2005).

Заключение. Длительное постоянное освещение приводит к развитию у животных хронического гастрита с признаками убыли эпителиоцитов желудочных желез и снижения их пролиферативной активности. Курс инъекций ночного эпифизарного гормона мелатонина обуславливает улучшение морфофункциональной картины слизистой оболочки желудка, т.е. мелатонин снижает выраженность морфогенетических признаков гастрита при моделировании его на животных путем длительного содержания их в условиях постоянного освещения.

Литература

1. Бондаренко Л. А., Губина-Вакулик Г. И., Сотник Н. Н., Геворкян А. Р. Влияние постоянного освещения на суточный ритм мелатонина и структуру pineальной железы у кроликов // Проблемы эндокринной патологии. 2005. № 4. С. 38–45.
2. Бондаренко Л. А., Кондакова І. К., Гладкова А. І. та ін. Гіпоpineалізм як чинник прискореного старіння серцево-судинної системи // Буковинський вісн. 2009. Т. 13, № 4. С. 41–45.
3. Осадчук М. А., Сибряев А. А., Киреева Н. В., Кветной И. М. Влияние мелатонина, включенного в комбинированное лечение при проведении антихеликобактерной терапии, на иммуногистохимические характеристики эпителиоцитов

- желудка у пациентов с дуоденальной язвой // Клиническая медицина. 2012. Т. 90, № 12. С. 48–52.
4. *Резніков О. Г.* Загальні принципи експериментів на тваринах // Ендокринологія. 2003. Т. 8, №1. С. 142–145.
 5. *Саватеева-Любимова Т. Н., Сивак К. В., Малинин В. В.* Гастропротективная активность аналогов модифицированного глутамил-триптофан дипептида и мелатонина // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2012. Т. 75, № 2. С. 17–21.
 6. *Шимчук С. Ф.* Влияние мелатонина, серотонина и гастрина на течение хронического гастрита у пожилых пациентов // Успехи геронтологии. 2005. Т. 16. С. 101–104.
 7. *Ganguly K., Swarnakar S.* Chronic gastric ulceration causes matrix metalloproteinases-9 and -3 augmentation: alleviation by melatonin // Biochimie. 2012. Vol. 94 (12). P. 2687–2698.
 8. *Saitoh T., Watanabe Y., Kubo Y. et al.* Intragastric acidity and circadian rhythm // Biomed Pharmacother. 2001. Vol. 55 Suppl 1. P. 138s–141s.
 9. *Thorsen K., Soreide J. A., Kvaloy J. T. et al.* Epidemiology of perforated peptic ulcer: age- and gender-adjusted analysis of incidence and mortality // World J Gastroenterol. 2013. Vol. 19 (3). P. 347–354.