

## ОСОБЛИВОСТІ ГІСТОЛОГІЧНОЇ КАРТИНИ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ СТРАВОХОДУ ЗА УМОВИ СТРЕС-ІНДУКОВАНОГО УРАЖЕННЯ

Львівський національний медичний університет  
імені Данила Галицького

**Вступ.** Гастроєзофагеальна рефлюксна хвороба (ГЕРХ) на сьогодні є лідером серед захворювань органів травлення за поширенням та частотою ускладнень. Останніми роками все більше уваги приділяється вивченню патогенетичних особливостей розвитку ГЕРХ та пошуку нових засобів, що впливають на регенерацію слизової оболонки стравоходу.

**Мета.** Дослідити структурно-функціональні особливості слизової оболонки стравоходу щурів за умов моделювання стрес-індукованих уражень та вивчити репаративний потенціал мелатоніну.

**Методи.** На підставі модельних серійних досліджень на щурах встановлено і проаналізовано особливості гістологічної картини слизової оболонки стравоходу за умови стрес-індукованого ураження, для чого використовували широковживану модель 3,5-годинного водно-імобілізаційного стресу (ВІС). Для оцінки ефективності мелатоніну для репарації застосовували препарат «Віта-мелатонін», який екзогенно вводили щурам у дозі 20 мг/кг, внутрішньоочеревинно за 60 хв. до індукції стресу. Для аналізу гістоморфологічних змін слизової оболонки стравоходу застосовували візуально-аналогову шкалу. Статистичний аналіз результатів і побудову діаграм здійснювали за допомогою програмного забезпечення STATISTICA та електронних таблиць Microsoft Excel. Результати вважали достовірними за  $p < 0,05$ .

**Результати.** За умов ВІС відзначено такі морфологічні зміни слизової оболонки стравоходу: локальне витончення та десквамація поверхневого шару. Просвіт судин власної пластинки та підслизової основи був подекуди звужений, місцями простежувався набряк сполучної тканини. Через 24 год після індукції ВІС переважали вакуолізація та загибель клітин з акантолізисом, десквамацією поверхневих частин епітеліального шару. Через 48 год після ВІС виявлено відшарування епітеліальної вистилки від базальної, помірну лейкоцитарну інфільтрацію, ознаки стази й геморагії у підслизовій основі. Використання мелатоніну позитивно вплинуло на процес загоєння стрес-асоційованих езофагеальних пошкоджень слизової оболонки стравоходу.

**Ключові слова:** стравохід, гістологічна картина, мелатонін.

**Вступ.** Функціональні та органічні порушення стравоходу на даний час посідають провідне місце серед кислото-асоційованої гастроентерологічної патології. Швидкий технологічний процес та ширше впровадження сучасного ендоскопічного обладнання, дозволяють більш точно верифікувати функціональні та органічні розлади стравоходу [6]. Патологія стравоходу, до якої належить гастроєзофагеальна рефлюксна хвороба (ГЕРХ), стравохід Барретта (СБ), алергічний езофагіт тощо, є актуальною медико-соціальною проблемою для всіх країн світу, причому для України характерне значне поширення ГЕРХ у останнє десятиліття [3]. Згідно Монреальського консенсусу (2006), ГЕРХ – це стан, що розвивається, коли рефлюкс шлункового вмісту викликає симптоми, що спричиняють неспокій і/або ускладнення [8]. Однак,

механізми, які відповідають за розвиток ГЕРХ, є багатфакторними і до кінця не дослідженими. Результати останніх фундаментальних досліджень дозволяють констатувати, що патогенез ГЕРХ включає порушення функції шлунка, дисфункцію антирефлюксного бар'єру, розлади автономної нервової системи, порушення стравохідного транзиту та кліренсу [1]. Згідно літературних повідомлень, до безпосередніх патогенетичних механізмів появи рефлюксів і розвитку езофагіту належать недостатність замикального механізму кардії, погіршення стравохідного кліренсу, зниження резистентності слизової оболонки нижньої частини стравоходу [5].

Власне резистентність слизової оболонки стравоходу обумовлена пре-епітеліальними, епітеліальними та постепітеліальними чинниками [4]. У тому випадку, коли механізми захисту слизової оболонки стравоходу виявляються неадекватними, рефлюкс шлункового вмісту може призвести до розвитку езофагіту. Ушкодження епітелію стравоходу починаються тоді, коли іони водню, пепсин або жовчні кислоти переборюють водний прошарок, що омиває слизову, преепітеліальний захисний шар та активну бікарбонатну секрецію. Клітинна резистентність залежить також від нормального рівня внутрішньоклітинного рН (7,3–7,4). Коли ці механізми виснажуються, а гастроєзофагеальний рефлюкс стає частішим та тривалішим, – виникає пошкодження слизової оболонки стравоходу – ГЕРХ. Методом, який допоміг би верифікувати захворювання міг би бути гістологічний аналіз структури стравоходу [1].

При вивченні особливостей патогенезу ГЕРХ велику увагу приділяють гормону епіфіза – мелатоніну. Останній є основним регулятором біологічних ритмів і має широкий спектр життєво важливих властивостей (гіпотермічна, антиоксидантна, протипухлинна, адаптогенна та інші). Порушення продукції та ритму секреції мелатоніну є пусковим моментом, який на початкових етапах призводить до виникнення десинхронізування, а пізніше – до виникнення органічної патології. Згідно літературних повідомлень, у хворих на ГЕРХ має місце вірогідне зниження синтезу мелатоніну порівняно із здоровими особами [7]. Таким чином, актуальним є дослідження гістологічної картини стравоходу за наявності ГЕРХ та вивчення репаративної дії мелатоніну.

**Мета.** Вивчити структурно-функціональні особливості слизової оболонки стравоходу щурів за умов моделювання стрес-індукованих уражень та оцінити репаративний потенціал мелатоніну.

**Матеріали і методи.** Проаналізовано результати експерименту на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою від 180 до 220 г, які утримувались в умовах віварію Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, відповідно до положень і дозволу університетського комітету з біоетики (протокол № 5 від 25.05.09) та міжнародних принципів Конвенції з біоетики Ради Європи 1997 р., Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, загальним етичним принципам, ухвалених I Національним конгресом з біоетики (2001). У всіх експериментах формували групу контрольних тварин (інтактні щури) і як плацебо використовували фізіологічний розчин. Тварин з експерименту виводили, застосовуючи етаназію під загальним знеболенням (50 мг/кг пентобарбіталу внутрішньоочеревинно). Для отримання неерозивних стрес-асоційованих уражень стравоходу у щурів використовували широковживану

модель 3,5-годинного водно-іммобілізаційного стресу (ВІС) за Takagi et al. (1964) із застосуванням 24-годинної харчової депривації з необхідним доступом до води. Для оцінювання спонтанного гоєння у слизовій оболонці стравоходу щурів було розділено на групи: 1) група контролю, до якої увійшли інтактні тварини; 2) тварини, що зазнали евтаназії відразу після індукції стресу; 3) тварини, що зазнали евтаназії через 24 год. після індукції ВІС; 4) тварини, що зазнали евтаназії через 48 год. після індукції ВІС. Для оцінювання регенераторно-відновлювальних процесів і структурно-функціональної реорганізації слизової оболонки стравоходу щурі 2-ї, 3-ї й 4-ї груп отримували плацебо (1,0 мл фізіологічного р-ну). Для оцінки ефективності мелатоніну для репарації застосовували препарат «Віта-мелатонін» виробництва ЗАТ „Київський вітамінний завод”, (Україна), який екзогенно вводили щурам у дозі 20 мг/кг, внутрішньоочередово за 60 хв. до індукції стресу.

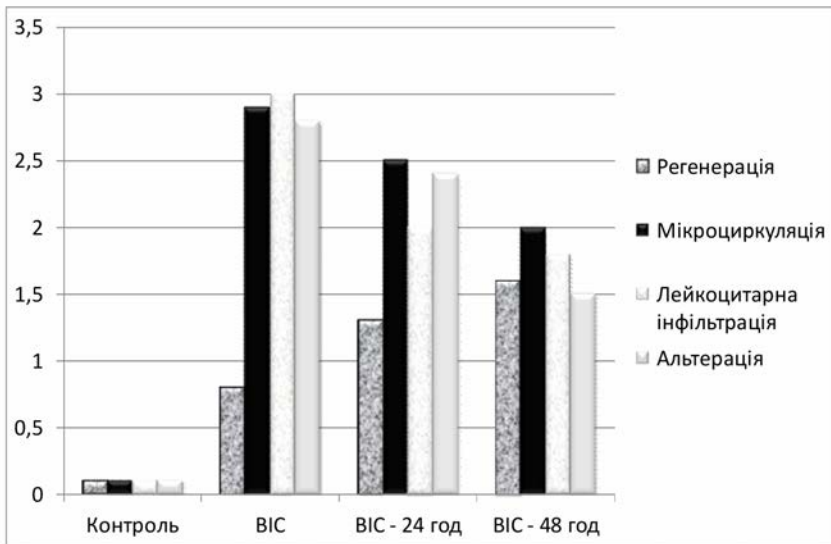
Для оцінювання уражень стравоходу використовували рекомендації симпозиуму стосовно модифікації Лос-Анджелеської класифікації (1994) патології стравоходу, затверджені міжнародною робочою групою у м. Вевей (Швейцарія), 2009 р. Для гістологічних досліджень матеріал фіксували в 10% забуференому розчині формаліну. Зрізи фарбували гематоксиліном та еозином. Препарати вивчали за допомогою мікроскопа Olympus BX 41 з цифровою камерою Olympus C4040Z із програмним забезпеченням Olympus DP-Soft. Для аналізу гістоморфологічних змін слизової оболонки стравоходу застосовували візуально-аналогову шкалу (ВАШ) з урахуванням критеріїв альтерації (0 – змін нема; 1 – розволокнення рогового шару; 2 – вогнищева базофілія мас кератину; 3 – десквамація рогових мас, вакуалізація клітин базального шару, везикулярні ядра); запалення (0 – змін нема; 1 – дифузний набряк підслизової; 2 – виражений нерівномірний набряк підслизової та незначна інфільтрація; 3 – виражений набряк та десквамація підслизової, периваскулярні або субепітеліальні інфільтрати); гіперплазія (прояв гоєння) (0 – змін нема; 1 – поодинокі гіперхромні ядра у базальних епітеліоцитах; 2 – помірна кількість мітозів; 3 – потовщення базальних епітеліоцитів); порушення мікроциркуляції (0 – норма; 1 – набряк; 2 – периваскулярні крововиливи).

Статистичний аналіз результатів і побудову діаграм здійснювали за допомогою комп'ютера IBM PC Pentium з використанням програмного забезпечення STATISTICA та електронних таблиць Microsoft Excel. Розподіл параметричних показників у вибірках був нормальним (гаусівським) – перевірка за W критерієм Шапіро–Вілка. У зв'язку з наявністю більш ніж двох груп дослідження порівняння параметричних характеристик здійснювали за В.П. Боровиковим (2001) шляхом апостеріорного аналізу (блок ANOVA – дисперсійний аналіз) з парним порівнянням середніх значень з допомогою критерію Ньюмена–Кейлса. Результати вважали достовірними за  $p < 0,05$ .

**Результати та їх обговорення.** У тварин, яким індукували стрес порівняно із групою контролю, спостерігали зміни товщини епітелію, локальне витончення, десквамацію поверхневого шару слизової оболонки стравоходу у люменальний просвіт. Просвіт судин власної пластинки та підслизової основи слизової оболонки стравоходу був подекуди звужений, місцями простежувався набряк сполучної тканини, що створювало враження звуження просвіту стравоходу та заповнення його десквамованими елементами поверхневого шару епітелію. Нейро-дистрофічні зміни, індуковані ВІС, викликали у роговому

шарі вогнищеві базофілію та паракератоз, відшарування кератинових мас від епітеліальної пластинки, вакуолізацію епітеліоцитів базального шару, дифузний нерівномірний набряк між епітеліальною вистилкою і підслизовою основою. При оцінюванні динаміки загоєння деструктивних змін, інтенсивності запалення та ознак гіперплазії встановлено, що через 24 год після індукції ВІС переважали вакуолізація та загибель клітин з акантолізмом, десквамацією поверхневих частин епітеліального шару, у підлеглій сполучній тканині – периваскулярні крововиливи та лейкоцитарні інфільтрати.

Багатофакторним ранговим аналізом гістологічних ознак альтерації слизової оболонки стравоходу через 48 год після ВІС виявлено відшарування епітеліальної вистилки від базальної (1,6 бала), помірну лейкоцитарну інфільтрацію, ознаки стазу й геморагії у підслизовій основі (рис. 1). Ознаками загоєння стрес-індукованих пошкоджень найчастіше були регресія деструктивних змін на (43%), тоді як зміни запалення на (40%) і порушення мікроциркуляції (на 32%) були меншої інтенсивності щодо тварин 2-ої групи.

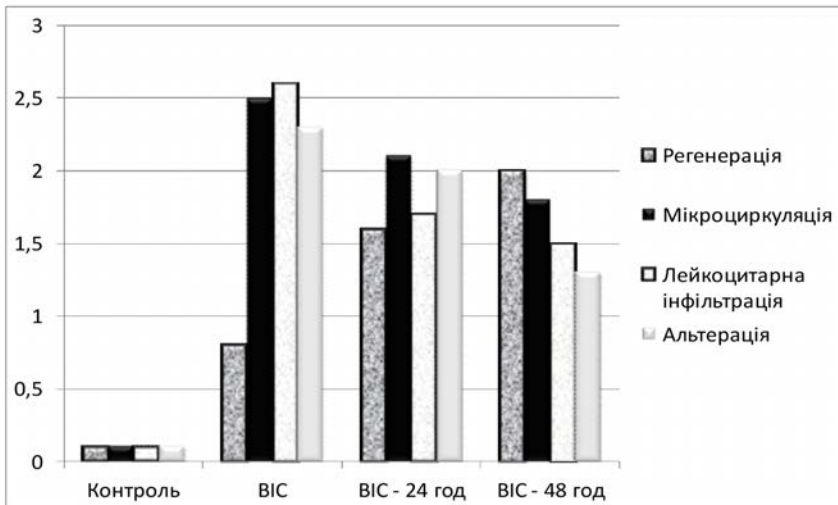


**Рис. 1. Гістологічні зміни слизової оболонки стравоходу щурів за умов індукції водно-іммобілізаційного стресу**

Таким чином, дані реакції можна вважати адекватними до термінів спонтанного відновлення, що було наслідками активування природних захисних сил епітеліального та стромального походження. Введення мелатоніну тваринам, яким індукували неерозивний езофагіт, сприяло зменшенню деструктивних змін, переважальним типом стали 2-бальні вияви альтерації (75 %), зменшились порушення мікроциркуляції щодо щурів без корекції. З'ясовано, що під впливом мелатоніну ангіотропні зміни у підслизовій слизовій оболонки стравоходу тварин на 24-ту і 48-му год. після

## ВНУТРІШНІ ХВОРОБИ

ВІС регресували інтенсивніше, ніж у тварин, які не отримали цього засобу (рис. 2). Ймовірно, таке активування репарації можна трактувати як вазотропний ефект мелатоніну, оскільки покращення локальної мікроциркуляції забезпечує швидше потрапляння у місця деструкції важливих матричних факторів, що детермінують виразкозагоєння. Результати досліджень дають підстави трактувати, що трансформація строми слизової оболонки стравоходу разом з ознаками реепітелізації та зменшенням лейкоцитарної інфільтрації, підслизового набряку є наслідком репаративної дії мелатоніну.



**Рис. 2. Гістологічні зміни слизової оболонки стравоходу щурів на тлі корекції мелатоніном за умов ВІС**

Отже, використання мелатоніну позитивно вплинуло на процес загоєння стрес-асоційованих езофагеальних пошкоджень слизової оболонки стравоходу.

**Висновки.** Встановлено, що у відповідь на стрес-індуковане ураження відбувається структурно-функціональна реорганізація слизової оболонки стравоходу. Застосування мелатоніну виявляло репаративний вплив на слизову оболонку стравоходу. **Перспективи подальших досліджень** полягають у з'ясуванні динаміки репарації в епітеліальному бар'єрі стравоходу за умов стрес-індукованого ураження, що допоможе ідентифікувати нові засоби для регенерації слизової оболонки стравоходу.

### Література

1. Бабак М.О. Оцінка за гістологічними критеріями стану слизової оболонки стравоходу у хворих на гастроєзофагеальну рефлюксну хворобу // Сучасна гастроентерологія. – 2010. – №3(53). – С. 35-41.
2. Бабак О.Я. Гастроєзофагеальна рефлюксна болезнь: от понимания механизмов развития заболевания к уменьшению клинических симптомов / О.Я.Бабак, Е.В. Колесникова // Сучасна гастроентерологія. – 2012. – №3 (65). – С. 32-38.

3. Вдовиченко В.І. Особливості гістологічної картини слизової оболонки дистального відділу стравоходу у хворих на гастроєзофагеальну рефлюксну хворобу та цукровий діабет II типу / В.І. Вдовиченко, Мкадмі Джігед, А.В. Острогляд // Практична медицина. – 2010. – № 1. – С. 91–94.

4. Дорофеев А.Э. Некоторые механизмы эзофагопротекции у больных гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью и их коррекция / А.Э. Дорофеев, М.В.Афанасьев, О.А.Рассохина // Сучасна гастроентерол.-2011.-№ 1 (57).-С. 78-83.

5. Міщук В.Г. Рівень гастрину в крові у хворих на гастроєзофагеальну рефлюксну хворобу та характер езофагеальних рефлюксів / В.Г. Міщук, В.Б. Бойчук // Сучасна гастроентерологія. – 2014. – №3(77). – С. 16-21.

6. Фадеенко Г.Д. Перекрестный синдром, функциональная диспепсия и неэрозивная рефлюксная болезнь: тактика врача общей практики / Г.Д. Фадеенко, Т.Л. Можина // Здоров'я України. – 2009. – №6/1. – С. 26-27.

7. Фадеєнко Г.Д. Рівень мелатоніну у хворих на ізольовану ГЕРХ та хворих на ГЕРХ у поєднанні з ішемічною хворобою серця та його зв'язок з клініко-морфологічними особливостями патології / Г.Д. Фадеєнко, О.В. Ізмайлова // Сучасна гастроентерологія. – 2014. – №6 (80). – С. 25-31.

8. Vakil N. The Montreal Definition and Classification of Gastroesophageal Reflux Disease: A Global Evidence Based Consensus / N. Vakil, S.V. van Zanten, P. Kahrilas [et al.] // Am. J. Gastroenterol. – 2006. – Vol. 101. – P. 1900-1920.

*М.Я.Савицкая*

## Особенности гистологической картины пищевода при условии стресс-индуцированного поражения

Львовский национальный медицинский университет  
имени Данила Галицкого

**Вступление.** Гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь (ГЕРБ) на сегодня является лидером среди заболеваний органов пищеварения за распространением и частотой осложнений. В последние годы все больше внимание уделяется изучению патогенетических особенностей развития ГЕРХ и поиску новых средств, которые влияют на регенерацию слизистой оболочки пищевода.

**Цель.** Исследовать структурно-функциональные особенности слизистой оболочки пищевода крыс при условиях моделирования стресс-индуцированных поражений и выучить репаративный потенциал мелатонина.

**Методы.** На основании модельных серийных исследований на крысах установлены и проанализированы особенности гистологической картины слизистой оболочки пищевода при условии стресс-индуцированного поражения, для чего использовали широкопотребляемую модель 3,5-часового водно-иммобилизационного стресса (ВИС). Для оценки эффективности мелатонина для репарации применяли препарат "Вита-мелатонин", который экзогенно вводили крысам в дозе 20 мг/кг, внутривнутрино за 60 мин. к индукции стресса. Для анализа гистоморфологических изменений слизистой оболочки пищевода применяли визуально-аналоговую шкалу. Статистический анализ результатов и построение диаграмм осуществляли с помощью программного обеспечения STATISTICA и электронных таблиц Microsoft Excel. Результаты считали достоверными при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** При условии ВИС отмечены такие морфологические изменения слизистой оболочки пищевода: локальное истончение и десквамация поверхностного слоя. Просвет сосудов собственной пластинки и подслизистой основы был кое-где сужен, местами прослеживался отек соединительной ткани.

Через 24 часа после индукции ВИС преобладали вакуолизация и гибель клеток с акантолизисом, десквамацией поверхностных частей эпителиального слоя. Через 48 часов после ВИС выявлено отслаивание эпителиальной выстилки от базальной, умеренная лейкоцитарная инфильтрация, признаки стаза и геморагии в подслизистой основе. Использование мелатонина положительно повлияло на процесс заживления стресс-ассоциированных эзофагеальных поврежденных слизистой оболочки пищевода.

**Ключевые слова:** пицевод, гистологическая картина, мелатонин.

*M. Ya. Savytska*

### Features of histological picture of an esophageal mucosa during stress-induced lesions

Danylo Halytsky Lviv National Medical University

**Introduction.** Gastro-esophageal reflux disease nowadays takes first place among the gastrointestinal disorders due to its frequency and its complications. During the last years more attention is paid to studying the new features of development GERD in order to develop a new medicine which can have influence on regeneration of an esophageal mucosa.

**Aim.** To study the structural and functional features of esophageal mucosa of rats at modeling stress-induced lesions and the reparative potential of melatonin.

**Materials and Methods.** Based on the model serial research studies on rats we distinguished and analyzed features of the histological picture of esophageal mucosa in case of the stress-induced lesions by using the model 3,5- hour water immersion stress (WRS) For the estimation of efficiency of melatonin in our experiment we used "Vita-melatonin" 20 mg/kg which was administered to the animals per abdomen 60 min before water immersion stress. In experiments on rats we discovered the influence of melatonin during the water immobilizing immersion stress on the morphological properties of the esophageal mucosa tissue. To analyze the histomorphological changes in the esophageal mucosa we used visual analogue scale. Statistical analysis of the results and charting was performed by using STATISTICA Spreadsheet and Microsoft Excel. The results were considered significant at  $p < 0.05$ .

**Conclusion.** Under condition of water immersion stress (WRS) there were observed such morphological changes of esophageal mucosa: local thinning and desquamation of the surface layer. The lumen of blood vessels in the lamina propria and submucosa was narrowed in some places, sometimes there was traced swelling of connective tissue. In 24 hours after induction of WRS there was dominated vacuolization and cell death with acantholysis, desquamation of the surface of the epithelial layer. In 48 hours after the WRS we revealed exfoliating epithelial lining from the basal, moderate leukocyte infiltration, signs of stasis and hemorrhage in the submucosa. The use of melatonin has a positive effect on the healing process in case of stress-induced lesions of esophageal mucosa.

**Key words:** stress, esophageal mucosa, melatonin.

**Відомості про автора:**

**Савицька Мар'яна Ярославівна** - к.м.н., асистент кафедри нормальної фізіології ЛНМУ ім. Данила Галицького. Адреса: 79010 м. Львів, вул. Пекарська, 69.