

Н. В. Шестернина

Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра патофизиологии, клинической патофизиологии

РОЛЬ ЖЕЛАТИНАЗЫ В И МАГНИЯ В НАРУШЕНИИ БАЛАНСА МЕЖДУ ФАКТОРАМИ АГРЕССИИ И МЕХАНИЗМАМИ ЗАЩИТЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АЦЕТАТНОЙ ЯЗВЕ ЖЕЛУДКА

УДК 616.33-002.44

В эксперименте на 18 белых крысах линии Вистар на фоне сформировавшейся ацетатной язвы желудка иммуногистохимическим методом определили увеличение удельного числа и интенсивности экспрессии желатиназа В-позитивных клеток в тканях препилорической зоны желудка. Снижение содержания магния в эритроцитарном пуле крови, полученном из подключичной вены, находится в отрицательной корреляционной зависимости с показателями, характеризующими активность в изъязвленных тканях желатиназы В, и в положительной – от площади язвенного дефекта.

Ключевые слова: желатиназа В, магний, экспериментальная язва желудка.

N. V. Shesternina

ROLE OF GELATINASE B AND MAGNESIUM IN IMPAIRED BALANCE BETWEEN AGGRESSION FACTORS AND PROTECTION MECHANISMS IN EXPERIMENTAL ACETATE GASTRIC ULCER

In the course of the experiment on 18 white Wistar rats with a developed acetate gastric ulcer we revealed an increase in the specific number and intensity of gelatinase B-positive cell expression using an immunohistochemical method in the gastric prepyloric tissues. A decrease in the amount of magnesium in the erythrocyte pool of blood obtained from the subclavian vein is in negative correlation with the parameters characterizing the activity of gelatinase B in ulcerated tissues and in positive correlation with the area of the ulcerous defect.

Keywords: gelatinase B, magnesium, experimental gastric ulcer.

В формировании эрозий и язв желудочно-кишечного тракта по-прежнему значимую роль отводят нарушению баланса между факторами агрессии и механизмами защиты [1]. Факторы агрессии повреждают как «слизистый барьер», так и ткани стенки желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). К таким факторам относятся соляная кислота, пепсиногены, включая катепсины, перекиси, свободные радикалы, желчные кислоты и т. д.

Точкой приложения действия повреждающих факторов служит как клеточный компонент тканей стенки ЖКТ, так и межклеточный матрикс [3, 4]. В метаболизме матрикса, в его создании и деструкции важную роль играют матриксные металлопротеиназы (ММП) [7].

В механизмах резистентности значимую роль играет скорость репарации, в реализации которой участвуют ферменты энергообразования и энергопотребления, синтеза белков, липопротеинов и других биологических макромолекул. Известно, что в активации более чем 300 ферментов энергообразования значимую роль играет магний, он необходим также для синтеза белков [10, 14, 15].

Дефицит магния в организме приводит к активации ММП на фоне системной соединительно-тканной дисплазии [2–4, 11, 13].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определить роль удельного числа желатиназа В позитивных клеток, интенсивность их экспрессии в тканях желудка, уровень клеточного внутриэритроцитарного магния в сдвиге баланса между факторами агрессии и механизмами защиты в тканях при экспериментальном эрозивно-язвенном повреждении желудка.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 18 белых крысах линии Вистар обоего пола массой (198 ± 3,8) г, находящихся на стандартной диете, с соблюдением правил проведения работ с экспериментальными животными [ETS-123 от 18.03.1986; Beauchamp T. L., Childress O. F., Principles of Biomedical Ethics. N.Y., Oxford, 1989; Федеральный закон от 24 апреля 1995 г. № 52-ФЗ «О животном мире»; стандарты GLP – правила лабораторной практики (приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19.06.2003 г. № 266)].

Животные были разделены на три группы: интактную, контрольную и экспериментальную. На крысах экспериментальной группы моделировали ацетатную язву по методу С. Окабэ

(2005) под нембуталовым наркозом из расчета 30 мг/кг массы. Крысам контрольной группы выполняли те же манипуляции, что и в экспериментальной группе, но не моделировали язвенного дефекта. Каждая группа животных включала по 6 крыс.

Животных выводили из эксперимента на 7-е сутки от момента моделирования с получением биологического материала: кровь из подключичной и воротной вен, и тканей из изъязвленной зоны препилорического отдела желудка.

Исследование активности желатиназы *B* проводили иммуногистохимическим методом по стандартной методике с использованием антител фирмы «Novocastra» (NCL-MMP9, для парафиновых блоков, рабочее разведение 1:40) [6]. В препаратах покровного эпителия (ПЭ) и собственной пластинки слизистой оболочки (клеточный компонент), (СПСО) при 400-кратном увеличении оценивали удельное число (в %) положительно окрашенных клеток. Реакция окрашивания оценивалась по трехбалльной шкале [9, 11].

Транспорт и перераспределение магния в организме оценивали по его уровню в эритроцитарном и плазменном пулах крови из подключичной, воротной вен. Содержание магния в эритроцитарной массе определяли по реакции с титановым желтым, содержание магния в плазме и лимфе – набором фирмы «Лаксма» [5].

Средние величины при нормальном распределении выражались как $M \pm t$, значимость различий оценивали по коэффициенту Стьюдента; при распределении отличном от нормального – как медиана (*Me*), 25 и 75 перцентиль, достоверность

различий оценивали с применением критерия Уилкоксона при уровне значимости $Q < 0,05$. Результаты исследований обработаны методом вариационной статистики с использованием стандартного пакета анализа с помощью электронных таблиц Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На 7-е сутки с момента моделирования формировалась типичная язва, обычно кратерообразной формы с грануляционным валом, отечностью, гиперемией, а также геморрагиями в слизистой оболочке. Площадь язвенного дефекта $30,95 \pm 6,7$ мм².

Как видно из табл. 1, удельное число и интенсивность экспрессии желатиназа *B*-положительных клеток в тканях желудка у интактных животных была слабо выражена.

В контрольной группе на фоне умеренной стресс-реакции отмечалась статистически незначимая активация желатиназы *B* в ПЭ и в СПСО желудка (клеточный компонент), приводящая, видимо, к ускорению обновления слизистой оболочки.

При экспериментальной ацетатной язве желудка в зоне воспалительной инфильтрации в покровном эпителии желудка выявлено увеличение интенсивности экспрессии ($Q < 0,05$) при наметившейся тенденции к увеличению удельного числа желатиназа *B*-положительных клеток ($Q > 0,05$). Наряду с этим в СПСО желудка (клеточный компонент) отмечалось увеличение удельного числа желатиназа *B*-положительных клеток ($Q < 0,05$) при максимально высокой интенсивности их окраски ($Q < 0,05$).

Таблица 1

Удельное число и интенсивность экспрессии желатиназа *B*-положительных клеток при экспериментальной ацетатной язве желудка на 7-е сутки с момента моделирования [25 и 75 перцентили]

Показатели		Исходное состояние	Контроль	Ацетатная язва
Покровный эпителий СОЖ	удельное число	10 [10; 10]	42,5 [17,5; 48,75]	52,5 [50; 62,5]
	интенсивность экспрессии	1,5 [1; 2]	1,5 [1; 2]	3 [3; 3]*
СПСО (клеточный компонент СОЖ)	удельное число	15 [2,5; 20]	32,5 [12,5; 48,75]	77,5 [55; 100]*
	интенсивность экспрессии	1,5 [0,25; 2]	2 [1,25; 2]	3 [3; 3]*

* Достоверность различий между показателями в контрольной группе и при экспериментальной ацетатной язве желудка, $Q < 0,05$.

Известно, что слизистая оболочка ЖКТ отличается высокой скоростью обновления, продолжительность прохождения клеток по ворсинке

кишечника составляет 3–4 суток [1, 4]. Возрастание показателей активности желатиназы *B* на фоне клинических признаков воспаления у крыс

на 7-е сутки с момента моделирования язвенного дефекта и достаточно большой площадью изъязвления свидетельствует, очевидно, об усилении деструктивно-воспалительных процессов в тканях зоны язвенного дефекта [11].

В пользу такого допущения свидетельствует выявленная достоверная корреляционная связь между площадью язвенного дефекта и удельным числом желатиназа *B*-позитивных клеток в покровном эпителии СОЖ ($r = 0,7$), числом и интенсивностью экспрессии в СПСО (клеточный компонент), ($r = 0,33$) и ($r = 0,74$) соответственно. Анализ показывает, что в этот период увеличение показателей активности желатиназы *B* является фактором агрессии,

приводящим к увеличению площади язвенного дефекта.

Нарастание активности желатиназы *B* в зоне воспалительного инфильтрата на фоне сформировавшейся ацетатной язвы сопровождалось снижением концентрации магния в эритроцитарной массе крови из подключичной вены в 1,3 раза ($p < 0,05$), в то время как в крови воротной вены его уровень практически оставался неизменным ($p > 0,1$).

Концентрация магния в плазме крови из подключичной, воротной вен на 7-е сутки с момента моделирования язвы по отношению к контролю значимо не изменялась ($p > 0,01$), (табл. 2).

Таблица 2

Содержание магния в эритроцитарной массе, плазме крови (ммоль/л) у крыс при экспериментальной ацетатной язве желудка на 7-е сутки с момента моделирования ($M \pm m$)

Кровь (ммоль/л)	Исходное состояние	Контроль	Ацетатная язва
Подключичная вена (эритроцитарная масса)	1,520 ± 0,089	1,800 ± 0,105 **	1,320 ± 0,082 ** #
Воротная вена (эритроцитарная масса)	1,480 ± 0,130	1,650 ± 0,110	1,690 ± 0,105
Подключичная вена (плазма)	0,981 ± 0,015	0,917 ± 0,011 *	0,914 ± 0,026 **
Воротная вена (плазма)	1,020 ± 0,013	0,884 ± 0,006 ***	0,923 ± 0,020 ***

По отношению к исходному состоянию: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; по отношению к контролю: # – $p < 0,05$; # – $p < 0,001$ – достоверность различий между ацетатной язвой и ацетатной язвой на фоне применения МСК.

Известно, что в период завершения формирования экспериментального язвенного дефекта в тканях зоны изъязвления уровень магния значительно снижается [6, 9, 12, 13], что является, очевидно, фактором свидетельствующим о мембранных повреждениях, приводящих или к усилению его потерь клеткой или нарушению его накопления в ней.

При корреляционном анализе выявлена значимая отрицательная связь между уровнем внутриэритроцитарного магния из подключичной вены, удельным числом желатиназа *B* позитивных клеток ($r = -0,59$), а также площадью язвенного дефекта ($r = -0,89$). Нарушение механизмов аккумуляции и потребления клетками магния и значимая роль магния в активации ферментов энергообразования и энергопотребления в реализации процессов пролиферации приводит к замедлению процессов репарации язвенного дефекта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При экспериментальной ацетатной язве желудка снижение содержания внутриэритроцитарного магния и увеличение удельного числа и интенсивности экспрессии желатиназы *B*

в тканях желудка сопряжено с формированием язвенного дефекта большего размера.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агрессивные факторы и механизмы защиты тканей желудочно-кишечного тракта, их роль в патологии / Л. Н. Рогова, Н. В. Шестернина, К. О. Заболотнева и др. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2014. – 136 с.
2. Бигельдина Н. А. Особенности регенераторного процесса слизистой оболочки желудка человека в различные возрастные периоды: дис. ... канд. мед. наук. – Волгоград, 2002. – 178 с.
3. Влияние магнийсодержащей композиции на интенсивность пероксидации, магниевый баланс и показатели воспалительной клеточной инфильтрации у крыс с экспериментальным хроническим воспалением эндометрия / Л. Н. Рогова, К. Ю. Тихаева, Н. В. Григорьева и др. // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2015. – № 2 (54). – С. 127–130.
4. Ивашкин В. Т. Школа клинициста. Язвенная болезнь – история медицины // Медицинский вестник. – 2006. – № 19 (362). – С. 9–10.
5. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям лабораторной диагностике. – М.: МЕДпресс-информ, 2004. – С. 579–591.

6. Концентрация магния и кальция в биологических средах и репарация тканей ЖКТ у стрессустойчивых и стресснеустойчивых крыс с экспериментальными язвами желудка до и после применения магнийсодержащей лекарственной композиции / Л. Н. Рогова, Н. В. Григорьева, В. В. Ермилов и др. // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2013. – № 2 (46). – С. 28–31.

7. Матриксные металлопротеиназы, их роль в физиологических и патологических процессах (обзор) / Л. Н. Рогова, Н. В. Шестернина, Т. В. Замечник и др. // Вестник новых медицинских технологий. – 2011. – № 2. – С. 86–89.

8. Поветкина В. Н., Рогова Л. Н. Особенности магниевого баланса у стрессустойчивых и стресснеустойчивых крыс и его роль в механизмах формирования ацетатной и стрессовой язвы желудка // Вестник новых медицинских технологий. – 2011. – № 2. – С. 83–85.

9. Поветкина В. Н., Рогова Л. Н. Удельное число клеток и интенсивность экспрессии эндотелиальной нитроксидсинтазы в тканях желудка в зоне изъязвления и уровень внутриэритроцитарного магния у стрессустойчивых и стресснеустойчивых крыс // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2013. – № 1. – С. 61–64.

10. Рогова Л. Н. Влияние бишофита на макроэлементный баланс в тканях желудка крыс при его эрозивно-язвенных повреждениях // Микроэлементы в медицине. – 2001. – Т. 3, № 2. – С. 56–59.

11. Рогова Л. Н., Шестернина Н. В. Роль желатиназы В и магния в формировании экспериментальной язвы желудка // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2015. – № 2, Т. 10. – С. 170–173.

12. Рогова Л. Н., Шестернина Н. В., Старавойтов В. А. Влияние магнийсодержащей композиции на магниевый баланс, интенсивность пероксидации и активность антиоксидантных ферментов у крыс с ацетатной язвой желудка // Вестник новых медицинских технологий. – 2011. – Т. 18, № 2. – С. 89–91.

13. Старавойтов В. А., Рогова Л. Н., Стаценко М. Е. Регенерация экспериментальной язвы желудка: роль магниевых балансов // Вестник Российского университета дружбы народов (серия медицина). – 2008. – № 7. – С. 532–535.

14. Тюренок И. Н., Ярошенко И. Ф., Рогова Л. Н. Mg^{2+} – Ca^{2+} баланс в тканях желудка у крыс с эрозивно-язвенными повреждениями и после применения бишофита // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2004. – № 10. – С. 29.

15. Rubin H. The logic of the Membrane, Magnesium, Mitosis (MMM) model for the regulation of animal cell proliferation // Science. – 2003. – Vol. 261. – P. 1280–1281.