

В.Й. Кімакович , П.О. Склярів , В.І. Ковалишин

Морфологічні зміни слизової оболонки товстої кишки при блокуванні H^+,K^+ -АТФази та ССК-2-гастринових рецепторів

У дослідях на щурах показано, що блокування H^+,K^+ -АТФази лансопразолом протягом 14 днів призводило до структурних змін епітеліоцитів, келихоподібних клітин, підвищенню проліферативних процесів слизової оболонки товстої кишки та концентрації гастрину в крові. Введення блокатора ССК-2-гастринових рецепторів проглуміду нівелює дію лансопразолу та знижує концентрацію гастрину в крові. Відзначено, що блокування H^+,K^+ -АТФази лансопразолом призводить до порушення структури поверхневих епітеліоцитів, тоді як активація процесів проліферації зумовлена впливом гастрину. Морфологічні зміни при дії лансопразолу можуть призводити до зміни процесів транспорту іонів, мікрогемодинаміки та активації процесів проліферації. Доцільно проводити моніторинг вмісту гастрину в крові пацієнтів при призначенні блокаторів H^+,K^+ -АТФази та гіпосекреції шлунка.

Ключові слова: H^+,K^+ -АТФаза, лансопразол, ССК-2-гастринові рецептори, проглумід, структура слизової оболонки товстої кишки.

ВСТУП

При лікуванні гастроєзофагальної рефлюксної хвороби, виразкової хвороби шлунка та дванадцятипалої кишки, а також при синдромі Золінгера–Елісона широко використовуються блокатори H^+,K^+ -АТФази – омепразол, лансопразол, пантопразол [8, 12, 15], дія яких супроводжується значним підвищенням у крові вмісту гастрину, який стимулює процеси проліферації та сприяє активації канцерогенезу у товстій кишці [9, 17, 21].

H^+,K^+ -АТФаза локалізується на мембранах парієтальних клітин шлункових залоз і поверхневих епітеліоцитів, а також епітеліоцитах крипти слизової оболонки товстої кишки (СОТК). Основна роль H^+,K^+ -АТФази товстої кишки пов'язана з реабсорбцією іонів калію та регуляцією внутрішньоклітинного рівня рН [4, 22].

При взаємодії гастрину з рецепторами ССК-2 (ССК-В) підвищується їх експресія,

активуються численні внутрішньоклітинні шляхи, що призводить до посилення процесів проліферації клітин [1, 20, 23]. Визначення впливу блокаторів ССК-рецепторів на тлі дії лансопразолу на процеси проліферації клітин товстої кишки потребує поглибленого вивчення [7, 11].

Метою нашої роботи було дослідження змін структури компонентів СОТК за умов двотижневого блокування H^+,K^+ -АТФази лансопразолом, а також введенні блокатора ССК-2-гастринових рецепторів проглуміду у взаємовідношенні зі вмістом гастрину у крові.

МЕТОДИКА

Проведено дві серії досліджень на 24 щурах згідно з загальними етичними принципами проведення експериментів на тваринах. У першій серії вивчали самостійну дію блокатора H^+,K^+ -АТФази лансопразолу (30 мг/кг); у другій серії – поєднану дію

© В.Й. Кімакович , П.О. Склярів , В.І. Ковалишин

лансопрозолу з блокатором ССК-2 гастринних рецепторів проглумідом (250 мг/кг). Препарати вводили перорально протягом 2 тиж. Забір матеріалу для досліджень здійснювали під уретановим наркозом (1,1 мг/кг). Після декапітації тварин частину дистального відділу товстої кишки поміщали у 2%-й розчин чотириокису осмію на 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,36) [6]. Вивчення та фотографування зрізів проводили за допомогою мікроскопа УЕМВ-100К.

При гістологічному дослідженні препарати СОТК забарвлювали гематоксилін-еозином. На мікрофотографіях контури ядра обводили та обчислювали їх площу за допомогою програми UTHSCSA ImageTool. Ступінь диспластичної трансформації епітелію СОТК шурів оцінювали на підставі аналізу: ширини СОТК як показника висоти епітеліоцитів, площі поперечного перерізу їх ядер і кількості епітеліальних клітин у криптах; глибини кишкових крипт. До морфологічних маркерів посилення синтетичних і секреторних процесів у епітеліоцитах відносяться, зокрема, збільшення ширини слизової оболонки, а також розмірів їх ядер і кількості.

Мікрофотографії отримано за допомогою цифрової фотокамери Olympus C-5050

Zoom (“Olympus Europe GmbH”, Японія) та мікроскопа Olympus BX-41 (“Olympus Europe GmbH”, Японія) при збільшеннях $\times 150-320$.

Концентрацію гастрину у крові визначали радіоімунним методом за допомогою набору фірми “MP Biomedicals”, LLC (США). Статистичну обробку результатів провели за допомогою критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Блокування H^+, K^+ -АТФази лансопрозолом протягом 2 тиж призводило до різкого підвищення концентрації гастрину в крові до $430 \text{ пг/мл} \pm 11,2 \text{ пг/мл}$ (у тварин контрольної групи – $103 \text{ пг/мл} \pm 7,4 \text{ пг/мл}$) і виражених змін структурних компонентів СОТК. Відзначалися зміни апікальної поверхні мембрани кишкових епітеліальних клітин з посмугованою облямівкою – зменшувалася кількість мікрворсинок (на 45 %, $P < 0,05$) деформувалися ділянки апікальної мембрани (рис. 1, а, б), що є одним з факторів, який призводить до зміни секреції та реабсорбції іонів і транспорту води у СОТК.

Відзначені зміни структури келихоподібних клітин – вони вміщували значну

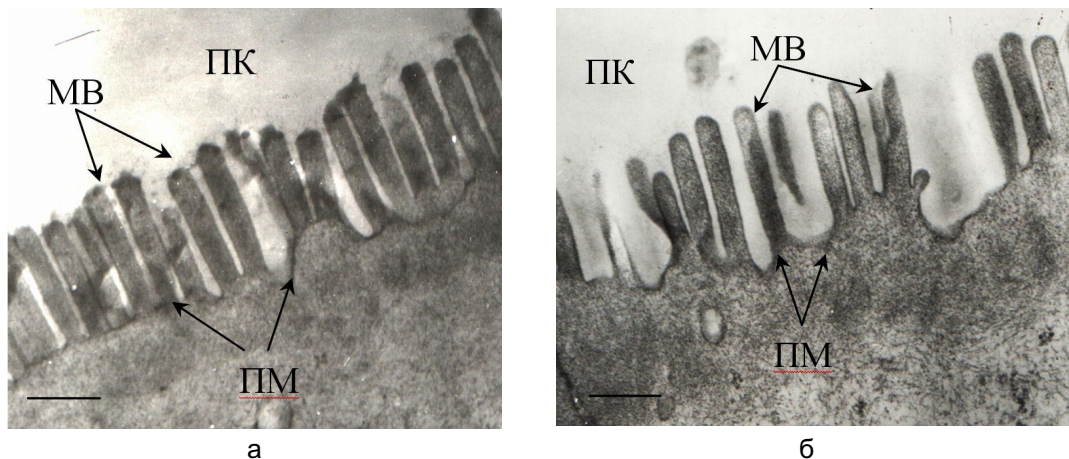


Рис. 1. Ультраструктура апікальної поверхні епітеліальних клітин з посмугованою облямівкою товстої кишки білих щурів в нормі (а) та за умов блокування H^+, K^+ -АТФази (б) лансопрозолом. Масштаб: 0,44 мкм. МВ – мікрворсинка; ПМ – плазматична мембрана, ПК – просвіт кишки

кількість гранул секрету, внаслідок чого клітина з подовженої форми (рис. 2,а) набували форми кола (рис. 2,б). Вказані зміни пов'язані з участю двох механізмів – з одного боку, гастрин призводить до посилення синтезу слизу, а з іншого – на мембрані келихоподібних клітин може також бути локалізована H^+, K^+ -АТФаза, блокування якої лансопразолом призводить до сповільнення екструзії слизу і внаслідок цього різко збільшується об'єм клітин. Секрет у келихоподібних клітинах нагромаджується, ймовірно, через активацію гастрином біосинтетичних процесів, внаслідок чого посилюється синтез слизу, а блокування H^+, K^+ -АТФази призводить до порушення його екструзії. А збільшення вмісту слизу в келихоподібних клітинах призводить до стискання цитоплазми епітеліальних клітин, а це у свою чергу – до порушення транспорту води та електролітів у товстій кишці.

При дії лансопразолу площа поперечного перерізу ядер епітеліоцитів підвищувалася на 14 % (з $1,76 \pm 0,06$ до $2,01 \text{ мкм}^2 \pm 0,15 \text{ мкм}^2$), глибина кишкових крипт збільшилася на 15 % (з $54,4 \pm 1,21$ до $62,4 \text{ мкм} \pm 4,42 \text{ мкм}$, $P < 0,05$), ширина слизової оболонки – на 14 % (з $122,5 \pm 3,03$ до $139,5 \text{ мкм} \pm 7,07 \text{ мкм}$, $P < 0,05$), а також збільшилася

кількість клітин крипт СОТК на 27 %, що свідчить про активацію проліферативних процесів. Лансопразол призводив до зростання десквамації та відшарування епітеліоцитів слизової оболонки і, відповідно, до порушення слизового бар'єру; розширення просвіту дна крипт та деструктивних змін епітеліоцитів крипт (рис. 4).

Блокування гастринових рецепторів ССК-2 проглумідом на тлі дії лансопразолу спричинювало відновлення кількості та структури мікроворсинок на апікальній мембрані епітеліоцитів, структури та секреції келихоподібних клітин (рис. 3). Концентрація гастрину у крові зменшувалася до $294,3 \text{ пг/мл} \pm 10,2 \text{ пг/мл}$ ($P < 0,05$) щодо впливу лансопразолу.

При поєднаному введенні лансопразолу та проглуміду площа поперечного перерізу ядер епітеліоцитів суттєво не змінювалася у порівнянні зі впливом лансопразолу – $1,95 \text{ мкм}^2 \pm 0,15 \text{ мкм}^2$, однак при цьому глибина кишкових крипт зменшилася на 42 % (до $35,88 \text{ мкм} \pm 3,39 \text{ мкм}$, $P < 0,05$), ширина слизової оболонки мала тенденцію до зниження ($131,6 \text{ мкм} \pm 6,68 \text{ мкм}$), число клітин у криптах зменшилося на 20 %. Блокування рецепторів ССК-2 призводило до зростання кількості залозистих клітин, зменшення просвіту дна крипт та зниження уш-

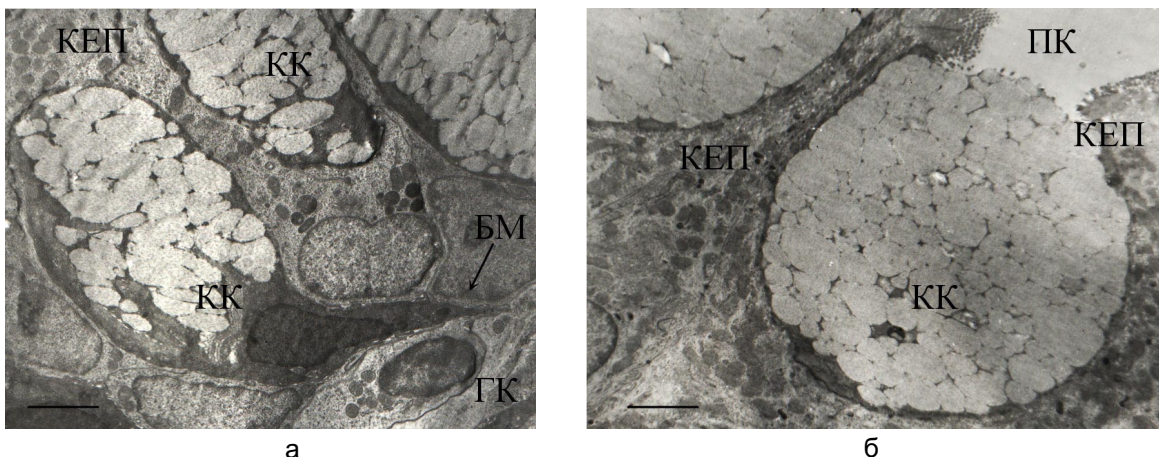


Рис. 2. Ультраструктура келихоподібних клітин слизової оболонки товстої кишки білих щурів в нормі (а) та за умов блокування H^+, K^+ -АТФази лансопразолом (б). Масштаб: 6,7 мкм. КК – келихоподібна клітина, ГК – гемокапіляр, БМ – базальна мембрана, ПК – просвіт кишки, КЕП – кишкова епітеліальна клітина з посмугованою облямівкою

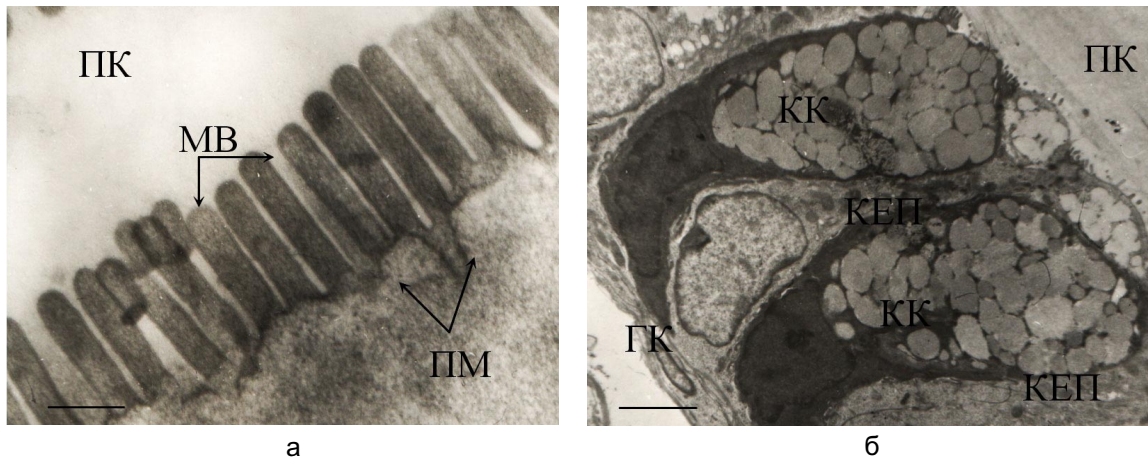


Рис. 3. Ультраструктура апікальної мембрани епітеліальної клітини з посмуговою облямівкою та келихоподібних клітин товстої кишки білих щурів за умов поєднаної дії лансопразолу та проглуміду. Масштаб: а – 0,44, б – 6,67 мкм. МВ – мікрворсинка; ПМ – плазматична мембрана, ПК – просвіт кишки. КК – келихоподібна клітина, ГК – гемокапіляр, КЕП – кишкова епітеліальна клітина з посмуговою облямівкою

кодження слизового бар'єру (див. рис. 4).

Отже, блокування рецепторів ССК-2 проглумідом на тлі дії лансопразолу знижує вміст гастрину у крові, кількість клітин у криптах та глибину кишкових крипт, а також сприяє відновленню апікальної мембрани поверхневих епітеліоцитів.

Отримані результати свідчать, що при двотижневому блокуванні H^+,K^+ -АТФази лансопразолом підвищувалася концентрація гастрину у плазмі крові і змінювалася структура компонентів СОТК. З одного боку, це пов'язано з блокуванням лансопра-

золем активності H^+,K^+ -АТФази, що призвело до зміни структури та функції епітеліальних і келихоподібних клітин, а з іншого – гастрин через рецептори ССК-2 стимулював проліферативні процеси. Зміни структури епітеліальних клітин при блокуванні H^+,K^+ -АТФази пов'язані з порушенням кислотно-лужного стану їх цитоплазми внаслідок зменшення інтенсивності транспортних потоків іонів та води [10]. Важливим є те, що при дії лансопразолу нагромаджувався слиз у келихоподібних клітинах, що дає змогу припустити наявність на них

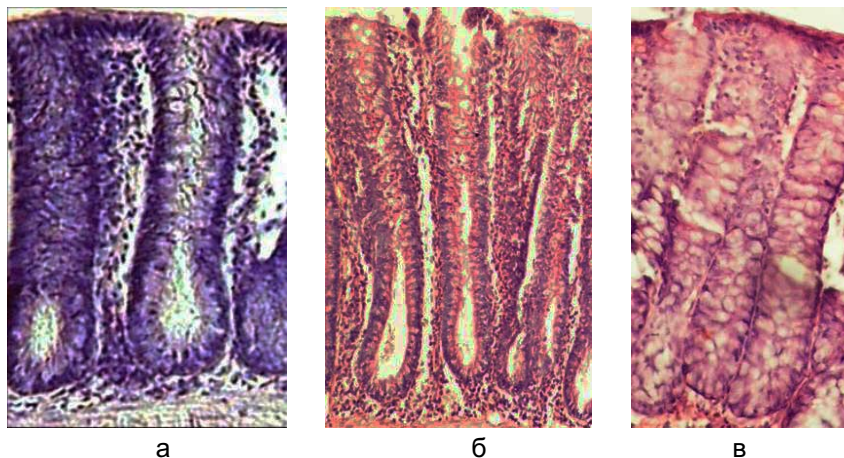


Рис. 4. Слизова оболонка товстої кишки за умов: а – норми; б – двотижневого введення лансопразолу; в – двотижневого блокування рецепторів ССК-2 проглумідом на тлі дії лансопразолу (x 400)

H^+, K^+ -АТФази, а зменшення виділення слизу призводить до пригнічення захисних механізмів і сприяє агресивній дії на епітеліоцити умовнопатогенної мікрофлори та розвитку ентеропатій.

Гастрин, взаємодіючи з рецепторами ССК-2, може викликати розвиток канцерогенезу [23]. У реалізації проліферативної дії гастрину беруть участь різні механізми, серед них відзначена стимуляція гастрином процесів транскрипції та експресії рецепторів ССК-2 у периферичних клітинах, що залежить від концентрації гормону у крові [1, 18]; гастрин активує експресію COX-2 [22]; сприяє посиленню ангиогенезу та порушує процеси апоптозу [17]. Слід також відзначити, що проліферацію колоноцитів активують прогастрин, Gly-гастрин та амідна форма гастрину [5, 13]. Окрім цього, гліцинівмісна та амідна форми гастрину експресуються у поліпах товстої кишки, а ССК-2-рецептори були виявлені у гіперпластичних поліпах. При прогресуванні аденоми та переходу її у форму карциноми спостерігається експресія *de novo* класичних ССК-2-рецепторів [19], що доводить участь гастрину у розвитку канцеру товстої кишки.

У наших дослідженнях за умов блокування ССК-2-рецепторів проглумідом на тлі дії лансопразолу відзначено гальмування проліферативної дії гастрину та зменшення ступеня uszkodження поверхні СОТК. Механізм дії проглуміду пов'язують зі зниженням тривалості життя клітин, зменшенням синтезу ДНК і білків, індексу проліферації, зменшенням тривалості фаз S та G2M клітинного циклу [14, 17]. Зменшення вмісту гастрину в крові при дії проглуміду, можливо, пов'язане із блокуванням ССК-рецепторів, що локалізуються на мембранах нейронів блукаючого нерва та нехолінергічних неадренергічних нейронах шлунка, що призводить до зниження виділення ацетилхоліну і, відповідно, його впливу на G-клітини [3].

Слід відзначити, що при дії лансопразолу не тільки гальмується виділення соляної кислоти у шлунку, а також змінюється функціональний стан H^+, K^+ -АТФази епітеліоцитів товстої кишки та зростає їх проліферація, знижуються активність процесів ліпопероксидації [16].

Враховуючи те, що при введенні блокаторів H^+, K^+ -АТФази швидко збільшується вміст гастрину у крові, що підвищує ризик канцерогенезу товстої кишки, пацієнтам, яким призначають препарати цієї групи, доцільно профілактично проводити моніторинг цього показника та ректороманоскопічне дослідження для оцінки стану СОТК.

ВИСНОВКИ

1. Введення щуром блокатора H^+, K^+ -АТФази лансопразолу протягом 2 тиж призводить до підвищення концентрації гастрину в крові та структурних змін поверхневих епітеліоцитів і келихоподібних клітин, активує процеси проліферації у товстій кишці щурів.

2. Блокування гастринових рецепторів ССК-2 проглумідом на тлі дії лансопразолу знижує концентрацію гастрину в крові та проліферативні процеси, а також ступінь uszkodження клітин СОТК.

3. При застосуванні блокаторів H^+, K^+ -АТФази та при гіпосекреторних станах шлунка, які супроводжуються гіпергастринемією, пацієнтам доцільно проводити моніторинг вмісту гастрину у крові.

**В.И. Кимакович, П.А. Складаров,
В.И. Ковалишин**

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ТОЛСТОЙ КИШКИ ПРИ БЛОКИРОВАНИИ H^+, K^+ -АТФАЗЫ И ССК-2-ГАСТРИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ

В экспериментах на крысах показано, что блокирование H^+, K^+ -АТФазы лансопразолом на протяжении 14 сут приводит к структурным изменениям эпителиоцитов,

бокаловидных клеток, повышению пролиферативных процессов слизистой оболочки толстой кишки и увеличению концентрации гастрин в крови. Введение блокатора ССК-2-гастриновых рецепторов проглумида нивелирует действие лансопризола и снижает концентрацию гастрин в крови. Отмечено, что блокирование H^+,K^+ -АТФазы лансопризолом приводит к нарушению структуры поверхностных эпителиоцитов, тогда как активация процессов пролиферации обусловлена эффектом гастрин. Морфологические изменения при действии лансопризола могут приводить к нарушению процессов транспорта ионов, микрогемодинамики и активированию процессов пролиферации. При назначении пациентам блокаторов H^+,K^+ -АТФазы или при гипосекреторном состоянии желудочных желез целесообразно проводить мониторинг содержания гастрин в крови.

Ключевые слова: H^+,K^+ -АТФаза, лансопризол, ССК-2-гастриновые рецепторы, проглумид, структура слизистой оболочки толстой кишки.

V.J. Kimakovich, P.O. Sklyarov, V.I. Kovalyshyn

MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE MUCOUS MEMBRANE OF LARGE INTESTINE UNDER THE BLOCKAGE OF H^+,K^+ -ATPASE AND GASTRIN RECEPTORS CCK-2

In experiments on rats, a 14-days blockade of H^+,K^+ -ATPase with lansoprazole was revealed to cause structural disorders in the epitheliocytes and goblet cells, enhancement of proliferation processes in the mucous membrane of large intestine and increase of gastrin concentration in blood. The blockade of H^+,K^+ -ATPase in epitheliocytes elicited an impairment of their structure, whereas activation of proliferative processes is caused by gastrin action. Morphological changes under the action of lansoprazole may cause disorders in the processes of ion transport, microhemodynamics and activation of proliferative processes. The blockade of CCK-2 gastrin receptors with proglumide resulted in a decrease of gastrin concentration in blood and reduction of lansoprazole action. Monitoring the blood gastrin levels is preferable to perform with the use of H^+,K^+ -ATPase blockers and under condition of stomach hyposecretion.

Key words: H^+,K^+ -ATPase, lansoprazole, gastrin receptors CCK-2, proglumide, structure mucous membrane of large intestine.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кімакович В.Й., Склярів П.О. Роль гастрину у процесах канцерогенезу товстої кишки // *Практ. медицина*. – 2007. – **13**, № 1. – С. 138–146.
2. Ashust H.L., Varro A., Dimaline R. Regulation of mammalian gastrin/CCK receptor (CCK2R) expression in vitro and in vivo // *Exp. Physiol.* – 2007. – **93**, № 2. – P.223–236.

3. Danzer M., Jovic M., Samberger C. et al. Stomach-brain communication by vagal afferents in response to luminal acid backdiffusion, gastrin, and gastric acid secretion // *Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2004. – **286**, № 3. – G 403–411.
4. Del Castillo J.R., Rajendran V.M., Binder H.J. Apical membrane localization of ouabain-sensitive K^+ -activated ATPase activities in rat distal colon // *Ibid.* – 1991. – **261**, № 6. – G 1005–1011.
5. Dockray G.J., Varro A., Dimaline R., Wang T. The gastrins: their production and biological activities // *Annu. Rev. Physiol.* – 2001. – **63**. – P.119–139.
6. Glauert A.M. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. – In: *Practical methods in electron microscopy / North-Holland (American Elsevier)*, 1975. – 207 p.
7. Gonzales-Puga C., Garcia-Navarro A. Selective CCK-A but not CCK-B receptor antagonists inhibit HT-29 cell proliferation: synergism with pharmacological levels of melatonin // *J. Pineal. Res.* – 2005. – **39**, № 3. – P. 243–250.
8. Hirschowitz B.I., Simmons J., Mohnen J. Clinical outcome using lansoprazole in acid hypersecretors with and without Zollinger-Ellison syndrome: a 13-year prospective study // *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* – 2005. – **3**, № 1. – P. 39–48.
9. Hollande F., Imdahl A., Mantamadiotis T. et al. Glycine-extended gastrin acts as an autocrine growth factor in a nontransformed colon cell line // *Gastroenterology*. – 1997. – **113**. – P. 1576–1588.
10. Hurlenko T. M., Beregova T.V., Voronina O. I. et al. The effect of long-term hypergastrinemia on the colonic mucosa morphofunctional indexes and methods for prevention of induced changes. – In: *III international conference “Neuro – humoral and cellular regulatory mechanisms of digestion processes” (October 4–6, 2007, Lviv, Ukraine)*. – Lviv, 2007. – P. 28–29.
11. Mussner J., Caca K. Developments in the inhibition of gastric acid secretion // *Blackwell Synergy: Eur. J. Clin. Invest.* – 2005. – **35**, Issue 8. – P. 469–475.
12. Piche T., Galmiche J.P. Pharmacological targets in gastro-oesophageal reflux disease // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* – 2005. – **97**, № 6. – P.333–341.
13. Seva C., Dickinson C.J., Yamada T. Growth-promoting effects of glycine-extended progastrin // *Science*. – 1994. – **265**. – P. 410–412.
14. Shen K., He S., He Y. Effects of proglumide, a gastrin receptor antagonist, on human large intestine carcinoma SW480 cell line // *Chin. Med. J. (Engl)*. – 1998. – **111**, № 12. – P. 1075–1078.
15. Shin J.M., Vagin O., Munson K. et al. Molecular mechanisms in therapy of acid-related diseases // *Cell Mol. Life Sci.* – 2008. – **65**, № 2. – P.264–281.
16. Sklyarov P.A., Kimakovich V.J. Early changes of lipoperoxidation processes in the large intestine under blockage of H^+,K^+ -ATPase, CCK-2 receptors and

- COX-2 in rats. – In: 15th United European Gastroenterology Week (27–31 October 2007), Gut. – **39**. – Suppl 1. – P. A314.
17. Smith A.M., Watson S.A. Review article: gastrin and colorectal cancer// Aliment. Pharmacol. Ther. – 2000. – **14**. – P.1231–1247.
18. Takeuchi K., Speir G.R., Johnson L.R. Mucosal gastrin receptor. III. Regulation by gastrin//Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 1980. – **238**. – G.1133–1140.
19. Takhar A.S., Eremin O., Watson S.A. The role of gastrin in colorectal carcinogenesis// Surgeon. – 2004. – **2**, № 5. – P. 251–257.
20. Thommesen L., Hofslie E., Paulssen R.H. Molecular mechanisms involved in gastrin – mediated regulation of cAMP – responsive promoter elements//Amer. J. Physiol. Endocrinol.Metab. – 2001. – **281**. – E. 1316–1325.
21. Triantafillidis J.K., Merikas E., Govosdis V. et al. Increased fasting serum levels of growth hormone and gastrin in patients with gastric and large bowel cancer// Hepatogastroenterology. – 2003. – **50**, Suppl 2. – celvi-cclx.
22. Watanabe T., Suzuki Y., Suzuki T. Ouabain-sensitive K(+)-ATPase in epithelial cells from guinea pig distal colon// Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 1990. – **258**. – G. 506–511.
23. Yao M., Song DH., Rana B., Wolfe MM. COX-2 selective inhibition reverses the trophic properties of gastrin in colorectal cancer// Brit. J. Cancer. – 2002. – **87**, № 5. – P.574–579.
24. Yassin R.R. Signaling pathways mediating gastrin's growth-promoting effects// Peptides. – 1999. – **20**. – P. 885–898.

Львів.нац. мед. ун-т ім. Данила Галицького

Матеріал надійшов до редакції 18.02.2009