

УЛЬТРАСТРУКТУРА ТОНКОГО КИШЕЧНИКУ ПРИ БАРОТРАВМІ**ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» (м. Дніпро)**

kosha.v@ukr.net

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Дослідження проведені в рамках наукової теми кафедри клінічної анатомії, анатомії та оперативної хірургії «Морфофункціональний стан органів і тканин експериментальних тварин та людини в онтогенезі в нормі та під впливом зовнішніх і внутрішніх чинників», № державної реєстрації 0117U003181.

Вступ. В останні роки все більшого значення набувають в абдомінальній хірургії травми органів черевної порожнини, зокрема кишечника. В структурі закритих тупих травм живота ушкодження тонкого кишечника коливаються в межах від 5 до 15% [1]. Травматичні ушкодження кишечника супроводжуються порушенням кровопостачання та моторно-евакуаторної функції. Виникаючі внаслідок травми ішемічно-реперфузійні порушення з подальшим розвитком перфорацій, перитонітом призводять до високої летальності. Структурно-метаболичні порушення, які виникають внаслідок мікроциркуляторних змін призводять до порушення бар'єрних функцій кишечника та подальшої ендогенної інтоксикації. Встановлення своєчасного діагнозу може бути ускладнене мінімальними клінічними симптомами роздратування очеревини у зв'язку з незначними ушкодженнями стінки кишечника та незначною кровотечею з судин брижі. Летальність в цій групі хворих коливається від 12,6 до 72% [2].

Фундаментальні дослідження слизового шару тонкого кишечника продовжують проводитись для виявлення як просторових, так і часових молекулярно-клітинних трансформацій як на етапах онтогенезу [3], так і при патологічних станах [4, 5]. Як свідчать останні дослідження пошук ранніх біомаркерів травматичного ушкодження внутрішніх органів, зокрема кишечника [6, 7], набуває все більшого розвитку.

Таким чином, враховуючі складність діагностики первинних вибухових ушкоджень тонкого кишечника, високу летальність хворих, тяжкість наслідків та відсутність специфічних діагностичних ознак в ранньому періоді травматичного періоду.

Метою нашого дослідження був аналіз ультраструктурних змін стінки тонкого кишечника після абдомінальної баротравми.

Об'єкт і методи дослідження. Об'єктом дослідження була стінка тонкої кишки лабораторних ставевозрілих щурів. У дослідженні було задіяно 20 тварин. Усі щури, які прийняли участь у експерименті, мали здоровий вигляд і були активні. Нами проведено дослідження змін структури тонкої кишки білих щурів масою 180 – 200 г віком 6-7 місяців.

Моделювання ударно хвильового впливу. Піддослідного білого щура вводили в тіопенталовий наркоз. Проводили вплив ударної хвилі на черевну стінку тварини, тому її розташували вертикально, черевною стінкою до мембрани, з фіксацією шиї, кінцівок, хвоста за допомогою фігурної металевої

конструкції з затиском. На відкритому кінцевому отворі камери низького тиску ми закріпили гумову діафрагму. Підключенням пристрою до стандартної електричної мережі нами було активовано електромагнітний клапан, який перекрив сполучення між камерами високого та низького тиску. Наступним етапом було приведено в дію компресор, який упродовж 5-10 секунд нагнітав повітряну суміш у камеру високого тиску. Після досягнення відповідного тиску в дію було приведено електромагнітний клапан, який відкрив сполучення і потік повітряної суміші з надлишковим тиском вивільнюється у камеру низького тиску. Одночасно після включення електромагнітного клапану відбулося відключення компресора. Досягнувши вихідного кінця цей потік повітря з надлишковим тиском (ударна хвиля) зруйнував діафрагму та вплинув місцево на піддослідну тварину. Момент розриву діафрагми було зафіксовано сенсором динамічного тиску.

Щурів контрольної групи вводили в тіопенталовий наркоз та проводили фіксацію. Щурів виводили з експерименту в першу годину після отримання ними абдомінальної баротравми. Експеримент виконаний з дотриманням правил проведення робіт щодо експериментальних тварин, із додержанням принципів гуманності, викладених в директивах Європейського співтовариства та Гельсінкської декларації.

Світлооптична мікроскопія. Для морфологічного дослідження використовували стінку тонкої кишки експериментальних тварин. Обробку отриманого матеріалу проводили за загальноприйнятими правилами світлової мікроскопії [8, 9]. З метою виготовлення парафінових блоків матеріал 24 години фіксували у 10%-вому забуференому розчині нейтрального формаліну (рН 7,0) із подальшою промивкою під проточною водою. Зневоднення зразків ми здійснювали у спиртах зростаючої концентрації згідно до стандартної методики. Парафінові зрізи товщиною 5-7 мкм отримували за допомогою мікротому МПС-2. Депарафіновані зрізи забарвлювали гематоксиліном та еозином. Мікроскопічне вивчення проводили з використанням тринокулярного світлооптичного мікроскопу «PrimoStarCarlZeiss» з фотовиходом та використанням об'єктивів $\times 10$, $\times 40$, $\times 100$.

Трансмійна електронна мікроскопія. Для проведення наступного електронно-мікроскопічного аналізу фрагменти тонкого кишечника лабораторних щурів забирали та фіксували за допомогою 2,5%-вого розчину глутаральдегіду, що виготовляли на 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,3). Постфіксацію матеріалу проводили у 1%-вому забуференому розчині OsO₄ протягом 1 години. Зневоднення тканини проводили за допомогою спиртів наростаючої концентрації та пропіленоксиду, після чого матеріал заключали в Епон-812 («SPI-Pon™ 812 Epoxy Embedding Kit», США).

Ультратонкі зрізи завтовшки 60-80 нм виготовляли за допомогою ультрамікротому УМТП-6М

(«SELMІ», Україна) та розміщували на опорних мідних сіточках (Mesh Regular Grid 200). Подальше подвійне контрастування за Рейнольдсом проводили 5%-вим водним розчином ураніацетату протягом 10 хв. при температурі +37°C з наступною імпрегнацією розчином цитрату свинцю по методу Рейнольдса протягом 15 хв. Дослідження проводили за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа ПЭМ-100-01 («SELMІ», Україна) при напрузі прискорення 70-75 кВ і первинних збільшеннях від 1500 до 20000 за стандартною схемою. Електронні мікрофотографії отримували за допомогою цифрової системи виводу зображень SEO-SCAN. Загалом, наше електронномікроскопічне дослідження проводили за стандартною схемою [10, 11].

Результати дослідження та їх обговорення. Мікроскопічне дослідження тонкого відділу кишечника білих щурів контрольної групи показало, що слизова, м'язова і серозна оболонки структурно розвинені, мають чіткі межі. Слизова оболонка містить ворсинки значної довжини, які виступають у просвіт порожнини кишечника та крипти незначної глибини. Аналіз гістологічних ознак стінки кишечника експериментальних тварин в першу годину після впливу ударної хвилі показав нам, що на верхівках ворсинок спостерігалася інтенсивна десквамація ентероцитів в просвіт кишечника, строма ворсин була набрякла, в підслизовому та адвентиційному шарах наявні численні ділянки відшарування (рис. 1).

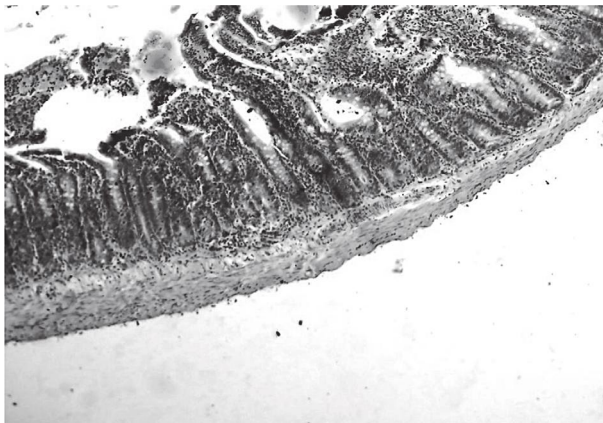


Рисунок 1 – Стінка тонкого кишечника. Забарвлення гематоксилином та еозином. 36.: ×100.

Ультраструктурна характеристика тонкого кишечника щурів контрольної групи. Слизова оболонка тонкої кишки щурів контрольної групи складалася з трьох пластинок епітеліальної, власної та м'язової. Поверхні ворсинок утворював одношаровий циліндричний епітелій, у складі якого розрізняли три типи клітин: стовпчасті епітеліоцити, келихоподібні клітини та ендокриноцити. У складі епітеліальної пластинки ворсинок і крипт слизової оболонки загалом переважали стовпчасті епітеліоцити з облямівкою, що мали типову для таких клітин будову. Стовпчасті епітеліоцити з облямівкою в середній частині ворсинки це циліндричної форми клітини які розташовані в один шар і добре контактують між собою. Стовпчасті епітеліоцити – це основний структурний і функціональний елемент, який забезпечує процеси травлення і всмоктування в тонкій кишці. Ця висока циліндричної форми клітина містить на апікальній

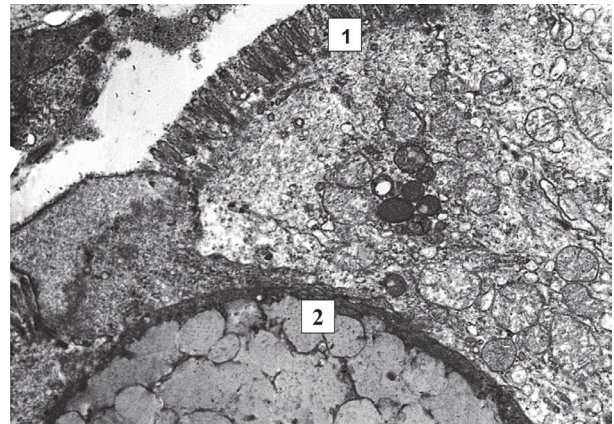


Рисунок 2 – Фрагмент апікальної частини епітеліальної пластинки тонкого кишечника щура контрольної групи. Електронна мікрофотографія, ×4 000.

Позначення: 1 – мікроросинки із глікокаліксом на поверхні; 2 – келихоподібна клітина.

поверхні мікроросинки, у базальній частині мають округле ядро, цитоплазма насичена органелами (рис. 2).

Ядра стовпчастих епітеліоцитів, розташованих у базальному полюсі, мали овальну форму та були орієнтовані вздовж клітин. В їх каріоплазмі в нормальному функціональному стані переважав еухроматин. Часто в ядрах спостерігалось одне або два ядерця. Між ядерними мембранами добре візуалізувався рівномірний перинуклеарний простір.

У цитоплазмі епітеліоцитів всі органели загального призначення розташовувались нерівномірно. Мітохондрії мали округлу або довгасту форму і зустрічались по всій цитоплазмі, але найбільше в центральній та апікальній ділянках. Виявлялися рибосоми та полісоми, первинні і вторинні лізосоми. Власна пластинка містила клітини фібробластного ряду помірну кількість лімфоцитів і плазмоцитів, іноді тканини базофіли та еозинофіли. Міжклітинна речовина сполучної тканини не мала добре виражений аморфний компонент, а тонкі колагенові еластичні волокна були розташовані неупорядковано (рис. 3).

У власній пластинці розташовувались кровоносні капіляри соматичного типу, які мали невеликі просвіти, суцільну ендотеліальну вистілку та базальну мембрану різної товщини. Ядра ендотеліоцитів були переважно еліпсоподібної форми з рівним контурами каріолеми, а перинуклеарна зона містила багато

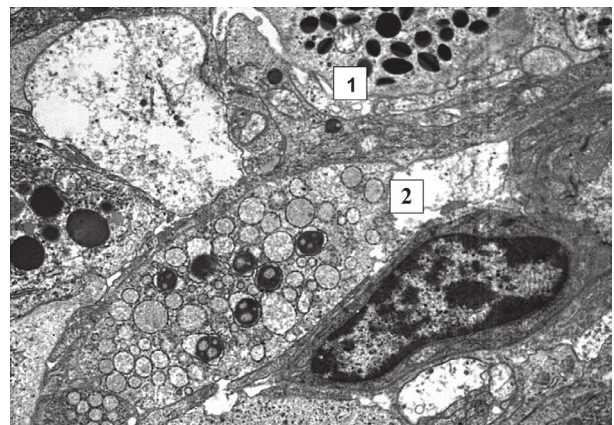


Рисунок 3 – Ділянка слизової оболонки тонкого кишечника щура контрольної групи. Електронна мікрофотографія, ×3 000. Позначення: 1 – еозинофіл; 2 – плазмоцит.

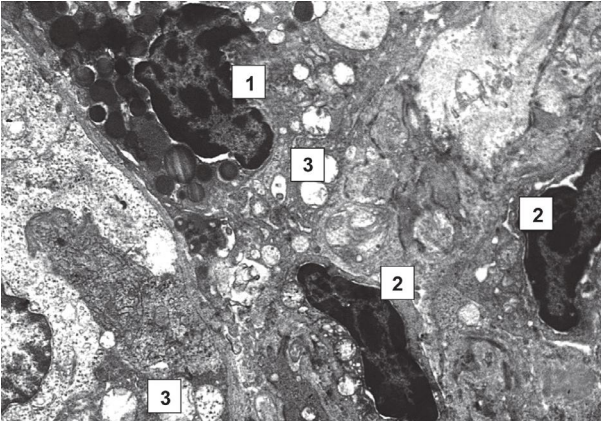


Рисунок 4 – Ділянка слизової тонкого кишечника щура за умов ударно хвильового впливу. Електронна мікрофотографія, $\times 2500$. Позначення: 1 – базофіли; 2 – клітини строми; 3 – явища напруження мітохондріального апарату ентероцитів у вигляді набряку та осередкової деструкції апарату крист.

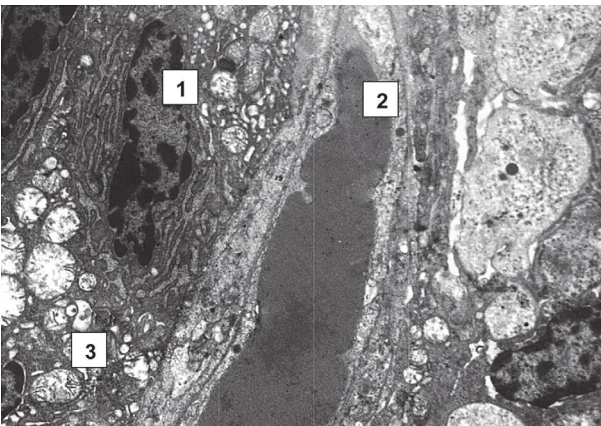


Рисунок 5 – Ділянка слизової тонкого кишечника щура за умов ударно хвильового впливу. Електронна мікрофотографія, $\times 2500$. Позначення: 1 – плазмоцит; 2 – гемокапіляр із сладж-синдромом еритроцитів; 3 – набряк мітохондрій.

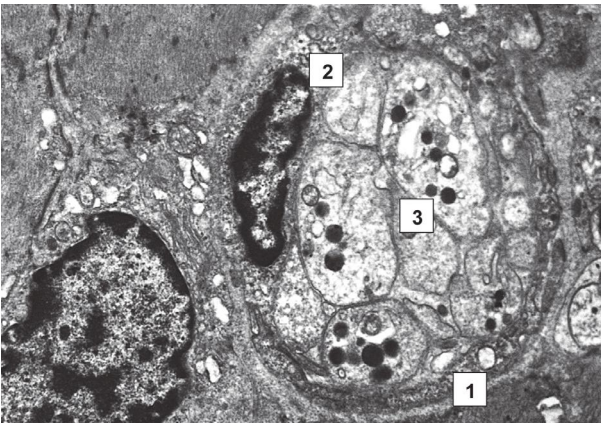


Рисунок 6 – Слизова оболонка ділянки слизової тонкого кишечника щура за умов ударно хвильового впливу з ознаками мікротромбоутворення. Електронна мікрофотографія, $\times 4000$. Позначення: 1 – гемокапіляр; 2 – ендотеліоцит; 3 – скупчення тромбоцитів у просвіті гемокапіляру.

органел. Окрім того у цитоплазмі ендотеліальних клітин розташовувались вакуолі різного діаметру.

Ультраструктурна характеристика тонкого кишечника щурів за умов ударно хвильового впливу. Електронномікроскопічний аналіз стінки тонкого кишечника щурів експериментальної групи виявив значний набряк пухкої сполучної тканини власної пластинки слизової оболонки, просвітлення компоненту міжклітинної речовини та зниження щільності волокнистого компоненту. Зі сторони ентероцитів слизової оболонки спостерігалися явища ушкодження мітохондрій клітин у вигляді набряку та осередкової деструкції апарату крист. Окрім того у власній пластинці слизової пластинки відзначалося скупчення лімфоцитів та плазмоцитів (рис. 4).

Дослідження змін з боку гематомікроциркуляторного русла слизової оболонки тонкої кишки щурів у відповідь на вплив ударної хвилі виявило наявність виразного набряку ендотелію, потовщення базальної мембрани та розширення периваскулярного простору за рахунок набряку.

Вплив ударної хвилі призводив до стазу крові у слизовій тонкого кишечника із формуванням сладж-синдрому еритроцитів у просвіті капілярів (рис. 5). Окрім того, у складі цитоплазми ендотеліоцитів добре візуалізувалися мітохондрії, що мали просвітлений матрикс та зруйновані кристи, кількість піноцитозних пухирців була значною.

Також альтеративний вплив ударної хвилі призводив до формування obturating microthrombi in the lumen of the mesenteric microcirculatory bed, which, as a rule, led to even more dramatic changes in blood flow in the form of the formation of acute ischemia in the wall of the mucosa of the small intestine of experimental animals (рис. 6).

Висновки.

1. Вплив ударної хвилі на передню черевну стінку експериментальних тварин призводить до дифузної травми стінки тонкого кишечника, яка супроводжується набряком та розшаруванням слизової, підслизової та серозної оболонок в гострому періоді травми.

2. На ультраструктурному рівні альтеративний вплив ударної хвилі переважно спричинює виразні зміни з боку гематомікроциркуляторного русла у вигляді периваскулярного набряку, набряку стінки капілярів, розвитку осередків стазу крові та формування мікротромбів, що ускладнює перфузію крові та створює передумови для виникнення локальної гострої ішемії у слизовій оболонці кишечника.

Перспективи подальших досліджень. Вивчити морфологічні та морфометричні зміни стінки тонкого кишечника в пізні терміни після баротравми.

Література

1. Pikoulis E, Delis S, Psalidas N, Leppäniemi A, Derlopas K, Pavlakis E, et al. Presentation of blunt small intestinal and mesenteric injuries. *Annals of The Royal College of Surgeons of England*. 2000;82(2):103-6.
2. Timerbaev VH, Valetova VV, Dragunov AV, Smirnova OV, Tukibaeva TF. Kislorodtransportnaya sistema i yeye kompensatornyye vozmozhnosti sredi postradavshikh vo vremya operatsiy po povodu travmy zhivota, oslozhennoy krvopoterey. *Zhurnal im N.V. Sklifosovskogo "Neotlozhnaya meditsinskaya pomoshch"*. 2019;8(2):124-131. DOI: <https://doi.org/10.23934/2223-9022-2019-8-2-124-131>. [in Russian]
3. Gomes JR, Ayub LC, DosReis CA. Goblet cells and intestinal Alkaline phosphatase expression (IAP) during the development of the rat small intestine. *Acta Histochemica*. 2017;119(1):71-77. DOI: 10.1016/j.acthis. 2016.11.010.

4. Shirpoor A, Barmaki H, KhademAnsari M, Lkhanizadeh B, Barmaki H. Protective effect of vitamin E against the nol-induced small intestine damage in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapie*. 2016;78:150-155. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.01.015>.
5. Lu F, Wang F, Chen Z, Huang H. Effect of mesenchymal stem cells on small intestinal injury in a rat model of a cute necrotizing pancreatitis. *Stem Cell Res Ther*. 2017 Jan 23;8(1):12. DOI: 10.1186/s13287-017-0471-z.
6. Saitoh W, Takada S, Hirao J, Shirai M, Iguchi T, Tsuji M, et al. Plasma citrulline is a sensitive safety biomarker for small intestinal injury in rats. *Toxicol Lett*. 2018 Oct 1;295:416-423. DOI: 10.1016/j.toxlet.2018.07.009.
7. Kozlov SV, Kosharnyy AV, Kosharnyy VV. Stan tonkoho kyshechnyku v hostryy period barotravmy. *Visnyk problem biolohiyi i medytsyny*. 2020;4(158): 269-271. [in Ukrainian].
8. Sarkisov DS, Perova YL. *Mikroskopicheskaya tekhnika*. Moskva: Meditsina; 1996. 542 s. [in Russian].
9. Bilash SM, Pronina OM, Koptev MM. Comprehensive morphological studies as an intergal part of modern medical science. Literature review. *Visnyk problem biolohiyi i medytsyny*. 2019;2.2(151):20-3. DOI: 10.29254/2077-4214-2019-2-2-151-20-23.
10. Kuo J. *Electron microscopy: methods and protocols*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc; 2007. 608 p.
11. Tverdokhib IV, Petruk NS, Berehovenko IM, Malkov II, Khripkov IS, Silkina YuV, Hudlett TO, Varin VV, Shevchenko KI, Zinenko DY, Ivanchenko MV, Pertseva NO, Halayda NO, vynakhidnyky; Derzhav zakl «Dnipropetrovs'ka medychna akademiya MOZ Ukrainy», patentovlasnyk. Sposib ustanovlennya koordynat ul'trastruktur pry transmisiyniy elektroni mikroskopi biolohichnykh ob'yektiv. Patent Ukrainy № 83611. 2013 Ver 25. [in Ukrainian]

УЛЬТРАСТРУКТУРА ТОНКОГО КИШЕЧНИКУ ПРИ БАРОТРАВМІ

Козлов С. В., Кошарний А. В., Кошарний В. В., Бондаренко Н. С., Живодьор І. А.

Резюме. В останні роки все більшого значення в абдомінальній хірургії набувають травми органів черевної порожнини, а зокрема саме кишечника. Метою нашого дослідження був аналіз ультраструктурних змін стінки тонкого кишечника після абдомінальної баротравми.

Аналіз гістологічних ознак стінки кишечника експериментальних тварин в першу годину після впливу ударної хвилі показав, що на верхівках ворсинок спостерігалася інтенсивна десквамація ентероцитів в просвіт кишечника, строма ворсин була набрякла, в підслизовому та адвентиційному шарах були наявні численні ділянки відшарування. Електронномікроскопічний аналіз стінки тонкого кишечника щурів в експериментальній групі виявив значний набряк пухкої сполучної тканини власної пластинки слизової оболонки, а також просвітлення компоненту міжклітинної речовини та зниження щільності волокнистого компоненту. З боку ентероцитів слизової оболонки спостерігалися явища uszkodження мітохондрій клітин у вигляді набряку та осередкової деструкції апарату крист. Окрім того у власній пластинці слизової оболонки відзначалося зупинення лімфоцитів та плазмоцитів. Дослідження змін зі сторони гематомікроциркуляторного русла слизової оболонки тонкої кишки щурів у відповідь на вплив ударної хвилі виявило наявність виразного набряку ендотелію, потовщення базальної мембрани, а також і розширення периваскулярного простору за рахунок набряку. Вплив ударної хвилі призводив до стази крові у слизовій тонкого кишечника із формуванням сладж-синдрому еритроцитів у просвіті капілярів. Окрім того у складі цитоплазми ендотеліоцитів візуалізувалися мітохондрії, що мали просвітлений матрикс та зруйновані кристи, кількість піноцитозних пухирців була значною.

Висновки. Вплив ударної хвилі на передню черевну стінку у експериментальних тварин призводить до дифузної травми стінки тонкого кишечника, яка супроводжується набряком та розшаруванням слизової, підслизової та серозної оболонок в гострому періоді травми.

На ультраструктурному рівні альтеративний вплив ударної хвилі переважно спричинює виразні зміни з боку гематомікроциркуляторного русла у вигляді периваскулярного набряку, набряку стінки капілярів, розвитку осередків стази крові та формування мікротромбів, що ускладнює перфузію крові та створює передумови для виникнення локальної гострої ішемії у слизовій оболонці кишечника.

Ключові слова: ультраструктура, баротравма, вибухова травма, стінка кишечника.

ULTRASTRUCTURE OF THE SMALL INTESTINE IN BAROTRAUM

Kozlov S. V., Kosharniy A. V., Kosharniy V. V., Bondarenko N. S., Zhyvodor I. A.

Abstract. In recent years, injuries of the abdominal cavity, in particular the intestine, have become increasingly important in abdominal surgery. The aim of our study was to analyze the ultrastructural changes of the small intestinal wall after abdominal barotrauma.

Analysis of histological signs of the intestinal wall of experimental animals in the first hour after exposure to the shock wave showed that on the tops of the villi there was intense desquamation of enterocytes into the intestinal lumen, impact. Electron microscopic analysis of the small intestinal wall of the rats of the experimental group revealed significant edema of the loose connective tissue of the mucosal plate, enlightenment of the intercellular component and a decrease in the density of the fibrous component. From the enterocytes of the mucous membrane there were phenomena of damage to cell mitochondria in the form of edema and focal destruction of the crista apparatus. In addition, the accumulation of lymphocytes and plasma cells was observed in the mucosal plate itself. The effect of the shock wave led to blood stasis in the mucous membrane of the small intestine with the formation of sludge syndrome of erythrocytes in the lumen of the capillaries. In addition, mitochondria with an enlightened matrix and destroyed cristae were visualized in the cytoplasm of endothelial cells, and the number of pinocytotic vesicles was significant.

Conclusions. The effect of the shock wave on the anterior abdominal wall of experimental animals leads to diffuse injury of the small intestinal wall, which is accompanied by edema and stratification of the mucous, submucosal and serous membranes in the acute period of injury.

At the ultrastructural level, the alternative effect of the shock wave mainly causes significant changes in the hematomicrocirculatory tract in the form of perivascular edema, capillary wall edema, development of blood stasis and microthrombus formation, which complicates blood perfusion and creates preconditions for local acute mucosal disease.

Key words: ultrastructure, barotrauma, explosive injury, intestinal wall.

*Рецензент – проф. Єрошенко Г. А.
Стаття надійшла 28.12.2020 року*