

# МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ОБРАТИМОСТИ ОСТРОЙ ИШЕМИИ ТОНКОЙ КИШКИ

Канд. мед. наук В. Г. Грома

Харьковский национальный медицинский университет

*В результате использования гистологических, гистохимических и морфометрических методик исследования в сравнительном аспекте с контрольной группой установлены критерии обратимости экспериментально моделированной ишемии тонкой кишки в зависимости от ее сроков. Материалом для исследования послужили участки тонкой кишки экспериментальных животных после моделирования у них двух-, четырех-, шести- и двенадцатичасовой мезентериальной ишемии путем лигирования магистральных сосудов.*

## МОРФОЛОГІЧНІ КРИТЕРІЇ ЗВОРОТНОСТІ ГОСТРОЇ ІШЕМІЇ ТОНКОЇ КИШКИ

Канд. мед. наук В. Г. Грома

*У результаті використання гістологічних, гістохімічних і морфометричних методик дослідження в порівняльному аспекті з контрольною групою встановлено критерії зворотності експериментально моделюваної ішемії тонкої кишки залежно від її термінів. Матеріалом для дослідження були ділянки тонкої кишки експериментальних тварин після моделювання у них дво-, чотири-, шести- і дванадцятигодинної мезентеріальної ішемії шляхом лігування магистральних судин.*

## MORPHOLOGICAL CRITERIA REVERSAL OF ACUTE ISCHEMIA OF THE SMALL INTESTINE

V. G. Groma

*As a result of the use of histological, histochemical and morphometric techniques to study in comparative aspect with the control group, established criteria for the reversal of the experimentally simulated ischemia of the small intestine depending on its terms. Material for the study served as portions of the small intestine in experimental animals after the simulation they have two-, four-, six- and twelve hours of mesenteric ischemia by ligation of main vessels.*

Из года в год число тематических исследований, опубликованных работ, конференций и симпозиумов, посвященных проблеме нарушения кишечного кровообращения, увеличивается [1, 2, 3].

Внедрение рентгенконтрастных методов диагностики и значительное углубление на их основе знаний анатомии и физиологии висцерального кровообращения казалось бы раз и навсегда решили проблему заболелаваний ангиогенного генеза. Тем не менее сосудистые поражения пищеварительного тракта встречаются все чаще, при этом они практически во всех случаях потенциально смертельно опасны и не всегда диагностируемы [4, 9, 10].

**Цель работы** — установление морфологических критериев обратимости экспериментально моделированной ишемии тонкой кишки в зависимости от ее сроков.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования проведены на 25-ти кролях-самцах породы шиншилла массой 3500–4000 гр. При работе с экспериментальными животными мы руководствовались требованиями Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 18.03.1986 г.), директивами Совета Европейского экономического общества по защите позвоночных животных (Страсбург, 24.11.1986 г.), законом Украины «О лекарственных средствах» (1996 г.), руководством ICH GCP (2008 г.), GLP (2002 г.); работы проводились в соответствии с требованиями и нормами, типовыми положениями по вопросам этики МЗ Украины № 690 от 23.09.2009 г.

Нарушение кровотока в бассейнах брыжеечных сосудов моделировалось у наркотизированных кетаминотом животных путем лигирования соответствующих участков брыжейки, выведением их из эксперимента через 2, 4, 6

и 12 ч с последующим забором материала для морфологического исследования. Группа контроля представлена 5-ю здоровыми животными, на органы которых воздействие экспериментального фактора не производилось.

При заборе материала во всех наблюдениях из тонкой кишки для исследования вырезались по три кусочка равной длины и ширины (0,3-0,5 см). Причем забор материала производился через 1,5 ч после забоя животного, когда гладкая мускулатура кишечника теряла способность к сокращению. После этого материал фиксировался в 10 % нейтральном растворе формалина в течение 24–48 ч. По истечении данного промежутка времени, материал, без промывки в воде, переносили в 70 % спирт на 10–15 мин и заливали парафином. Из приготовленных парафиновых блоков изготавливали серийные срезы толщиной  $4-5 \times 10^{-6}$  м с последующей их окраской гистологическими и гистохимическими методами.

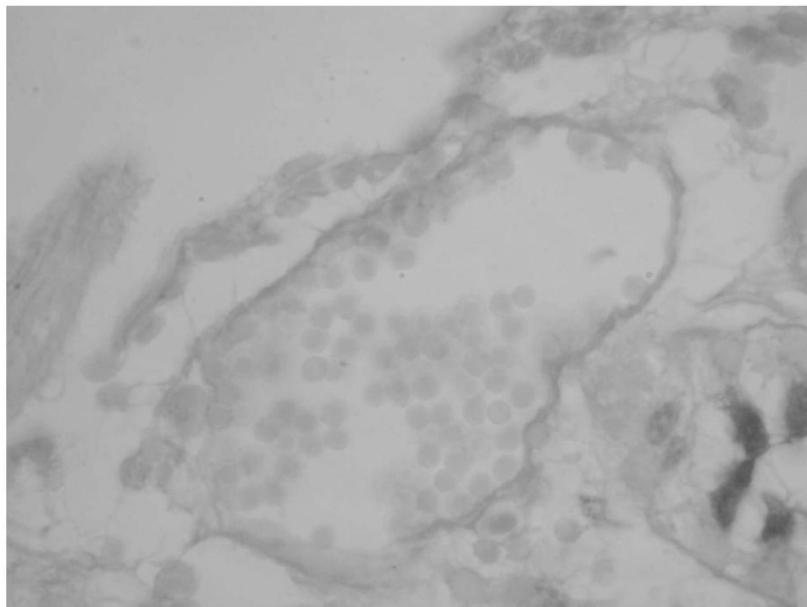
В качестве гистологических методик использовали окраску гематоксилином-эозином и пикрофуксином по Ван Гизону. Срезы, окрашенные гематоксилином-эозином, использовали для определения общего строения стенки тонкого кишечника, наличия изменений в основных структурных ее компонентах, а также для оценки состояния сосудистого компонента органа. Окраска срезов пикрофуксином по Ван Гизону позволила дифференцировать и изучить соединительно-тканые структуры в составе основных компонентов стенки кишечника. Морфометрическим методом был определен средний диаметр сосудов микроциркуляторного русла в составе стенки органа. Для оценки степени выраженности отека в стенке кишки использовался полуколичественный метод «плюсов». При этом степень отека оценивалась следующим образом: «+» — слабо выраженный; «++» — умеренно выраженный; «+++» — сильно выраженный. Также полуколичественным методом «плюсов» оценивалась выраженность полнокровия сосудов, при этом регистрировалось наличие или отсутствие в них сладж-феномена эритроцитов и микротромбов. Также на препаратах, окрашенных по Лили, определялось наличие или отсутствие очагов ишемии в гладкомышечном слое стенки кишки, а также оценивались степень их распространения и количество [6, 7].

При оценке инфильтрации стенки кишки сегментно-ядерными лейкоцитами обращали внимание на то, в каких слоях кишечной стенки имеется инфильтрация. Степень инфильтрации также оценивали полуколичественным методом «плюсов». Отмечали наличие или отсутствие распада лейкоцитов с оценкой уровня их кариорексиса. Кроме этого, фиксировали наличие и количество в воспалительном клеточном инфильтрате макрофагов. Для оценки степени повреждения сосудистой стенки обращали внимание на состояние морфофункциональной активности эндотелиоцитов, наличие очагов десквамации интимы сосудов, а также на состояние базальных мембран. Функциональная активность эндотелиоцитов стенки органа была проанализирована при использовании гистохимических методик: реакции Фельгена–Россенбека для выявления ДНК (контроль — гидролиз с соляной кислотой), метода Браше для визуализации РНК (контроль с кристаллической рибонуклеазой). Изучение препаратов, окрашенных гистологическими методами, а также морфометрическое исследование проводились на микроскопе Olympus BX-41 с использованием программ Olympus DP-Soft (Version 3:1) и Microsoft Excel [5].

Полученные в результате морфометрического исследования цифровые данные обработаны методами математической статистики с использованием вариационного, альтернативного и корреляционного анализов. При этом вычислены среднее арифметическое, степень дисперсии, среднеквадратическое отклонение, средняя ошибка разницы, вероятность различия. Вероятность различия между двумя средними при малых выборках определяли руководствуясь критерием Стьюдента с соблюдением условия  $(n_1+n_2-2)$  [8]. При определении степени вероятности допускали точность  $p < 0,05$ , что соответствует  $P > 95,0$  %.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Комплекс проведенных исследований позволил выявить, что по мере увеличения продолжительности жизни экспериментальных животных после лигирования аркад артерий и вен единым блоком увеличивается средний диаметр сосудов микроциркуляторного русла (от  $6,62 \pm 0,25 \times 10^{-6}$  м при двухчасовой ишемии



*Рис. 1. Животное, выведенное из эксперимента через 4 ч. Размытость и нечеткость контуров базальных мембран сосудов. Окраска PAS-реакцией. Увеличение  $\times 1000$*

до  $9,89 \pm 0,36 \times 10^{-6}$  м и  $10,03 \pm 0,66 \times 10^{-6}$  м, соответственно, при четырех- и шестичасовой ишемии, с тотальным некрозом стенки капилляров при двенадцатичасовой ишемии). Также, по мере увеличения длительности ишемии, прогрессивно нарастали морфологические признаки повреждения базальных мембран капилляров в виде разрыхленности, нечеткости контуров и истончения, местами вплоть до полного исчезновения (рис. 1).

Все это приводило к повышению проницаемости микрососудов и формированию прогрессирующего отека как в слизистой оболочке, так и в мышечном слое тонкой кишки. При этом отек максимален в группе животных, выведенных из эксперимента через 6 и 12 ч после его начала. Наростала также степень полнокровия сосудов микроциркуляторного русла; нарушались реологические свойства крови: уже через 2 ч после начала эксперимента в единичных капиллярах выявлялся сладж-феномен эритроцитов.

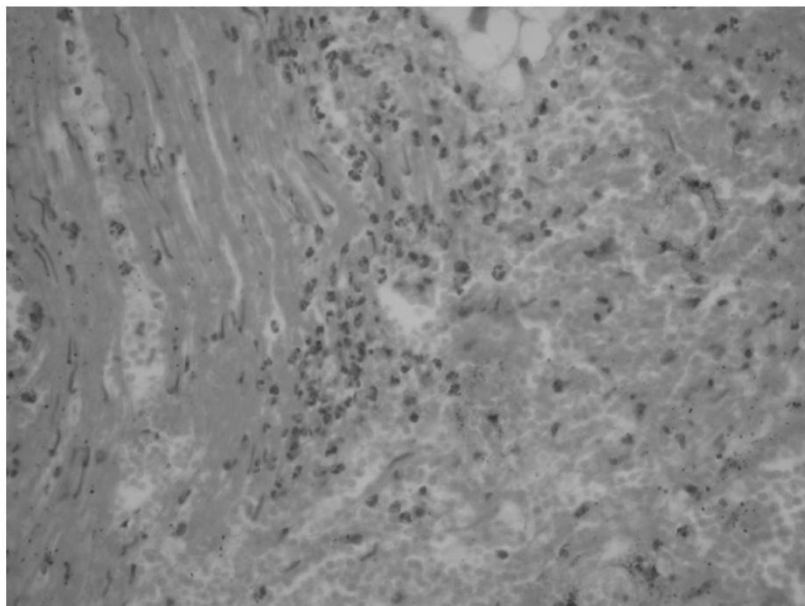
При морфологической оценке состояния интимы микрососудов регистрировали признаки повышения уровня морфофункциональной активности эндотелиоцитов. Однако уже через 4 ч после начала эксперимента появлялись единичные микрофокусы десквамации эндотелиальных клеток. У животных, выведенных

из эксперимента через 6 ч, деэндотелизация микрососудов была выражена уже сильно. Повреждение интимы приводило к активации XII фактора свертываемости крови — фактора Хагемана, и формированию множества микротромбов как в сосудах стенки кишки, так и в ее брыжейке.

По мере продолжительности эксперимента нарастали признаки экссудативного гнойного воспаления в стенке кишки. Выявлялись признаки краевого стояния лейкоцитов и постепенно нарастающая инфильтрация сегментно-ядерными лейкоцитами. Кроме этого, прогрессивно нарастали признаки гибели нейтрофилов и имело место постепенное увеличение явлений их кариорексиса (рис. 2).

Причем, следует отметить, что если у животных, выведенных из эксперимента через 2 и 4 ч воспалительный инфильтрат локализовался только в слизистом и мышечных слоях, то через 6 и 12 ч выявлялся фибринозно-гнойный перипроцесс на серозе (рис. 3).

Через 4 и 6 ч после начала эксперимента в воспалительном инфильтрате присутствовали макрофаги, которые, видимо, фагоцитировали обломки цитоплазмы и ядер погибших лейкоцитов. У животных, выведенных из эксперимента через 6 ч, на фоне резко выраженного гнойного воспаления, охватывающего все слои



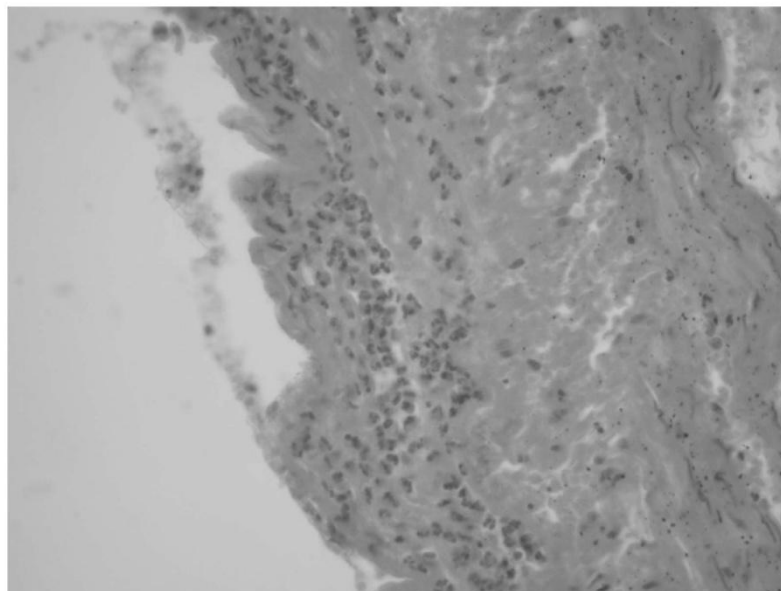
*Рис. 2. Животное, выведенное из эксперимента через 4 ч. Фокус лейкоцитарной инфильтрации с явлениями карирексиса. Окраска гематоксилином с эозином. Увеличение  $\times 400$*

стенки кишки, появлялись единичные микро-фокусы некротизации ткани в виде геморрагического инфарктирования. Через 12 ч после начала эксперимента геморрагический инфаркт кишки характеризовался как субтотальный.

### **ВЫВОДЫ**

1. При острых нарушениях брыжеечного кровотока, согласно гистоморфологическим

данным, повреждения базальных мембран капилляров, нарастание полнокровия сосудов микроциркуляторного русла с повышением его проницаемости и прогрессивным отеком оболочек кишки, нарушение реологических свойств крови и повреждения интимы сосудов с последующей активацией факторов свертывания крови и, как следствие, формирование микротромбов в сосудах стенки кишки



*Рис. 3. Животное, выведенное из эксперимента через 12 ч. Массивные фибринозно-гликозные наложения на серозной оболочке кишки. Окраска гематоксилином с эозином. Увеличение  $\times 200$*

и брыжейки, прогрессирование экссудативного гнойного воспаления в стенке кишки составляют основные звенья патогенеза острой ишемии кишки.

2. Проведенные гистологические, морфометрические и гистохимические исследования препаратов стенки тонкой кишки в условиях моделированного острого нарушения брыжечного кровотока позволили установить, что по мере продолжительности эксперимента катаболические процессы начинают превалировать над репаративными, достигая максимальной

степени к 6 ч ишемии и приводя к 12 ч к некрозу ишемизированного участка стенки кишки.

Морфологические методы диагностики дают ценную, а порой и незаменимую для лечащего врача информацию, определяя как тактику, так и успех лечения больного. Особенно ценными становятся эти данные в ургентной ситуации. Установление достоверных морфологических критериев обратимости острой ишемии кишечника определяет бесспорную *перспективность* и необходимость дальнейших экспериментальных исследований.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Гринчук Ф. В.* Экспериментальне дослідження нових способів визначення життєздатності кишкової стінки / Ф. В. Гринчук // Клінічна анатомія та оперативна хірургія.— 2009.— Т. 8, № 3. — С. 38–40.
2. *Даниленко І. А.* Оптимізація визначення життєздатності кишкової стінки в експериментальній моделі гострого порушення мезентеріального кровообігу / І. А. Даниленко, М. Г. Кононенко, О. П. Манжос [та ін.] // Вісник наукових досліджень.— 2010.— № 3.— С. 84–86.
3. *Кононенко М. Г.* Об'єктивізація визначення життєздатності кишки / М. Г. Кононенко, Л. Г. Кащенко, І. А. Даниленко, О. М. Антоненко // Актуальні питання клінічної медицини: матеріал міжнародного науково-практичного конференції студентів, молодих вчених, лікарів та викладачів, 21–23 квіт. 2011 р. — Суми: СумДУ, 2011.— Ч. 2.— С. 17–18.
4. *Кригер А. Г.* Диагностика мезентериального тромбоза / А. Г. Кригер // Эндоскопическая хирургия. — 2005. —Т. 11, № 1. — С. 66 — 67.
5. *Лапач С. Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич.— К.: МОРИОН, 2001. — 408 с.
6. *Лили Р.* Патогистологическая техника и практическая гистохимия / Р. Лили. — М.: Мир, 1960. — 648 с.
7. *Микроскопическая техника: руководство / под ред. Д. С. Саркисова, Ю. Л. Перова.* — М.: Медицина, 1996. — 544 с.
8. *Сергиенко В. И.* Математическая статистика в клинических исследованиях / В. И. Сергиенко, И. Б. Бондарева. — М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 2000. — 256 с.
9. *Acosta S.* Endovascular therapeutic approaches for acute superior mesenteric artery occlusion / S. Acosta, B. Sonesson, T. Resch // Cardiovasc. Intervent. Radiol. — 2009. — Vol. 32. — P. 896–905.
10. *Aschoff A. J.* Evaluation of acute mesenteric ischemia: accuracy of biphasic mesenteric multi-detector CT angiography / A. J. Aschoff, G. Stuber, B. W. Becker [et al.] // Abdom. Imaging. — 2009. — Vol. 34, № 3. — P. 345–357.