

В.І. Півторак, М.В. Бурков*Кафедра клінічної анатомії та оперативної хірургії (зав. – проф. В.І. Півторак) Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова*

УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ОСОБЛИВОСТІ ДИФУЗНОЇ НЕЙРОЕНДОКРИННОЇ СИСТЕМИ ДВНАДЦЯТИПАЛОЇ КИШКИ ПІД ЧАС ВИНИКНЕННЯ ГОСТРОЇ КИШКОВОЇ НЕПРОХІДНОСТІ

Резюме. У динаміці розвитку високої обтураційної гострої тонкокишкової непрохідності в клітинах дифузної нейроендокринної системи виявлені деструктивні зміни, які проявляються зменшенням загальної кількості ендокринних клітин та водночас зростанням кількості зруйнованих ендокриноцитів. Ультраструктурні зміни характеризуються порушенням цілісності мембран окремих секреторних гранул з можливістю виходу секрету в цитоплазму, порушенням структури мітохондрій, просвітленням їх матриксу та дезінтеграцією крист.

Ключові слова: дванадцятипала кишка; гостра кишкова непрохідність; дифузна нейроендокринна система.

За даними вітчизняних і зарубіжних досліджень, тяжкість перебігу гострої кишкової непрохідності залежить від ендогенної інтоксикації, поліорганної недостатності і нейроендокринної дисрегуляції [1]. У порожнині кишки розвивається накопичення рідини та газів при підвищеному внутрішньопросвітному тиску, мікроциркуляторній дисфункції стінки кишки й ураженні слизової оболонки [2].

У літературі досить широко висвітлені зміни в стінці дванадцятипалої кишки під час виникнення кишкової непрохідності, її корекції, висвітлено відновлення її функцій після усунення обтураційної непрохідності [3, 4], проте поза увагою залишилося вивчення змін клітин нейроендокринної системи. Ендокринні клітини шлунково-кишкового тракту виділяють ряд біологічно активних речовин, що володіють широким спектром як місцевих, так і системних ефектів, що, в кінцевому рахунку, впливає на ріст і розвиток організму. Свій вплив на стан секреторної функції та моторики кишки має і нейроендокринна система, яка представлена тут багатьма ендокринними клітинами, що дифузно розміщені серед інших клітин кишкового епітелію і зазнають аналогічних змін [5]. З огляду на важливу роль APUD системи шлунково-кишкового тракту в якості одного з ключових регуляторів гомеостазу організму, вивчення змін структури ендокриноцитів дванадцятипалої кишки при кишковій непрохідності є кроком до з'ясування патогенезу хвороби.

Нами досліджений морфологічний стан клітин нейроендокринної системи дванадцятипалої кишки при моделюванні високої гострої обтураційної тонкокишкової непрохідності.

Мета дослідження: встановити ультраструктурні особливості дифузної нейроендокринної системи (ДНЕС) дванадцятипалої кишки при моде-

люванні високої гострої обтураційної кишкової непрохідності (ВГОКН).

Матеріал і методи. Експериментальні дослідження виконані на 20 білих статевозрілих щурах-самцях масою 300-350 г. Досліди проводились з урахуванням Правил доклінічної оцінки безпеки фармакологічних засобів (GLP), закону України № 3447 – IV Про захист тварин від жорстокого поводження від 21 лютого 2006 року. Перед дослідженням тварини проходили карантин у віварії протягом тижня, утримувались в однакових умовах, отримували однаковий харчовий раціон. Тварини розподілені на 2 групи: контрольну (5) і дослідну (15). Операції проводили під кетаміновим наркозом: внутрішньоочеревинно вводився 2% розчин кетаміну з розрахунку 0,2 мл на 100 г ваги тварини. У контрольній групі виконували розтин передньої черевної стінки з наступним її пошировим ушиванням. Тваринам дослідної групи створювали модель ВГОКН, для чого під кетаміновим наркозом виконували верхню серединну лапаротомію. Після знаходження пілоричного відділу шлунка та дванадцятипалої кишки знаходили першу петлю порожньої кишки. Лінійкою відміряли 30 см від її початку і, зробивши отвір у безсудинній зоні брижі, поворозкою перев'язували кишку, досягаючи лише перекриття її просвіту та зберігаючи кровопостачання. Черевну стінку зашивали наглухо. Евтаназію проводили шляхом передозування тіопенталу натрію через 24, 48 та 72 години.

Для мікроскопічного дослідження використовували шматочки дванадцятипалої кишки, їх фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну. Препарати забарвлювали за методом Ван-Гізона, гематоксилином-еозином, для вивчення ендокриноцитів фарбували за методом Гримелюса та Массона-Гамперля. Для електронно-мікроско-

підного дослідження кусочки дванадцятипалої кишки фіксували у 2,5% розчині глютаральдегіду на 0,1 г фосфатному буфері та дофіксували в 1% розчині чотирьохокису осмію на фосфатному буфері, в 1% розчині танінової кислоти, зневоднювали в батареї спиртів зростаючої концентрації та ацетоні, проводили в сумішах ацетону та епону та заливали в суміш епону та аралдиту [6]. Морфологічні структури контрастували в процесі зневоднення матеріалу насиченим розчином уранілацетата, а на зрізах – цитратом свинцю. Зрізи товщиною 40-60 нм, отримані на ультрамікроскопі УМТП-7, вивчали в електронному мікроскопі ТЕСЛА БС-500.

Результати дослідження та їх обговорення.

Вивчаючи гістологічні зрізи стінки дванадцятипалої кишки інтактних тварин, забарвлених гематоксилін-еозином, ми спостерігали оксамитову поверхню слизової оболонки, утворену кишковими ворсинками, кожна з яких була оточена ліберкюновими криптами. Деякі крипти відкривалися біля основи ворсин, тоді як інші мають циркулярний напрямок і, можливо, огинають ворсинку. Поверхня ворсинок утворена шаром стовбчастих ентероцитів, серед яких знаходили помірну кількість келихоподібних клітин. Сполучнотканинна основа ворсинок містить нерозширені кровоносні мікросудини і розширені лімфатичні капіляри. Поміж ними – клітини сполучної тканини, моноцити, лімфоцити, окремі нейтрофіли. М'язова оболонка тонкої кишки не змінена, має два шари гладких м'язових волокон, між якими місцями визначаються вегетативні нервові ганглії.

Під час вивчення зрізів стінки тонкої кишки інтактних тварин, забарвлених за методом Гримелюса та Массона-Гамперля, ми спостерігали ендокриноцити, які були повністю заповнені гранулами або заповнені на дві третини. Серед популяції ендокриноцитів нам траплялися клітини відкритого, які досягали просвіту кишки апікальним відростком, та закритого типу. Ядра ендокриноцитів зміщені ближче до апікальної частини клітини, тоді як у ділянці базальної частини розміщені секреторні гранули. Більша частина ендокриноцитів мала криптову локалізацію.

Ендокринні клітини епітелію слизової та тонкої кишки розташовані серед епітеліоцитів подинці чи рідше групами по 3-4 клітини. Найчастіше траплялись ЕС-клітини, А-подібні чи D-ендокриноцити. Дуже рідко виявляли клітини змішаного типу: екзо-ендокринні та ендо-ендокринні.

ЕС-клітини були переважними представниками популяції ендокриноцитів шлунково-кишкового тракту. Гранули ЕС-клітин відрізнялись значним поліморфізмом, оточені безперервною мембраною та мали високу електронну щільність. ЕС-клітини мали ядра з округлим чи рідше неправильним розташуванням ядерної мембрани без глибоких інвагінацій (рис. 1). Хроматин розташо-

ваний відносно рівномірно, і лише по периферії ядра він концентрувався у вигляді електроннощільних фрагментів. Навіть при великих скупченнях хроматину не була втрачена двоконтурність ядерної мембрани.

Апікальна частина ЕС-клітин могла сягати просвіту кишки, однак основна маса гранул концентрувалася в базальній частині клітин. ЕС-клітини часто утворювали цитоплазматичні поля з секреторним матеріалом, які проходили паралельно до базальної мембрани епітелію. Поверхня клітин була порівняно рівною з наявністю нечисельних невеликих відростків.

А-подібні клітини округлої форми, з ексцентрично розташованим ядром, не досягали просвіту кишки. Багаточисельні секреторні гранули А-подібних клітин мали округлу форму, високу електронну щільність та гладеньку мембрану. Деякі мембрани, які оточуючі гранули, мають звивисту конфігурацію. Між гранулою та мембраною, що її обмежує, є вузький простір зниженої електронної щільності, який не завжди рівномірно оточує вміст гранули. Останній має дрібнозернисту будову.

D-клітини мали видовжену чи овальну форму, їх апікальна частина не сягала просвіту крипт, гранули D-клітин відрізнялися відносною однорідністю та гомогенністю (рис. 2). Дуже чітко структура D-гранул та А-гранул відрізнялася при суміжному розташуванні відповідних клітин. Поблизу базальної мембрани периферія секреторних гранул мала дещо розмиті краї. Інші структури клітини незначно відрізнялися від інших видів ендокриноцитів. Гранулярна ендоплазматична сітка представлена внутрішньоклітинними сплюсненими каналами чи цистернами, що містять сконцентрований матеріал помірної електронної щільності. У цитоплазмі реєструвались вільні та зв'язані з мембранами рибосоми. Виявлялась переважно базальна локалізація гранулярного ендоплазматичного ретикулуму.

Ендокриноцити слизової оболонки тонкої кишки за умов високої кишкової непрхідності вище

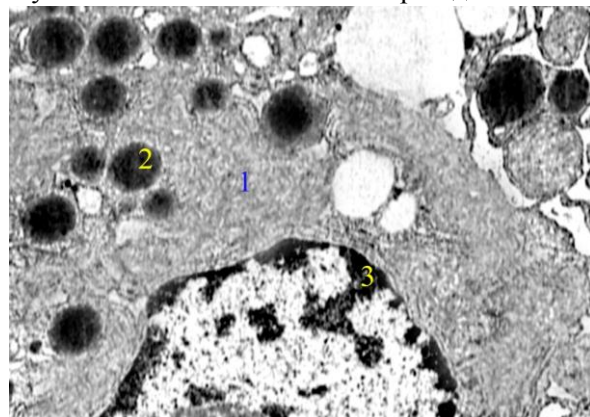


Рис. 1. ЕС-клітина з розвинутим ендоплазматичним ретикулумом (1), наявністю характерних ендокринних гранул (2) та скупченням хроматину по периферії ядра (3). Електронна мікроскопія. Контроль. x20000

місця блокади різко відрізняються від аналогічних клітин у ворсинках і криптах кишки тварин контрольної групи. Характеристика ендокринних клітин за вмістом секреторних гранул різко змінюється. У цій групі ми спостерігали ендокриноцити, цитоплазма яких мало насичена гранулами аж до повної дегрануляції (рис. 3).

Ми спостерігали досить значне представництво ендокриноцитів ворсинкової і криптової локалізації, що заповнені секреторними гранулами на одну третину і менше. Розподіл за локалізацією (крипта чи ворсинка) був приблизно рівним. Також, як варіант реакції на моделювання кишкової непрохідності, ми натрапляли на поодинокі ендокриноцити в стані повної дегрануляції.

Під час вивчення гістологічних препаратів тонкої кишки тварин з більшим строком від моменту створення непрохідності звертає на себе увагу те, що ми все рідше виявляли ендокриноцити з більшою наповненістю цитоплазми секреторними гранулами (рис. 4).

Коли ми моделювали ВГОКН в клітинах ДНЕС дванадцятипалої кишки, то спостерігали ультраструктурні зміни. У клітинах ДНЕС водночас з гранулами звичайної електронної щільності

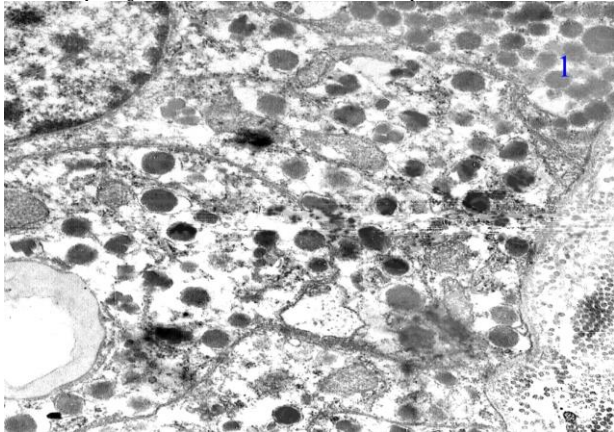


Рис. 2. D-клітина з наявністю гомогенних секреторних гранул округлої форми (1). Електронна мікроскопія. Контроль. $\times 15000$

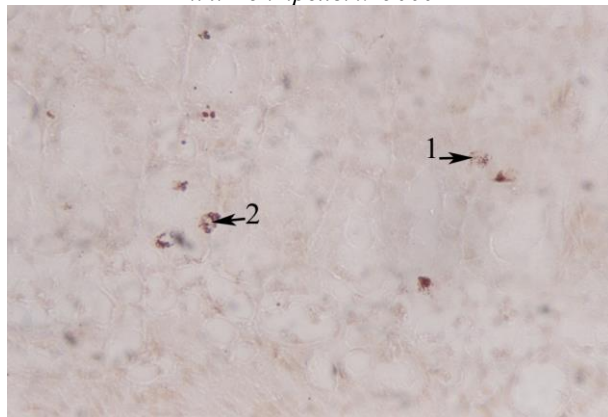


Рис. 3. Дегранульовані ендокриноцити (1) та клітини насичені гранулами на третину (2) у слизовій оболонці привідної петлі тонкої кишки. Кишкова непрохідність - на 3 добу експерименту. Зabarвлення за Массоном-Гамперлем. $\times 400$

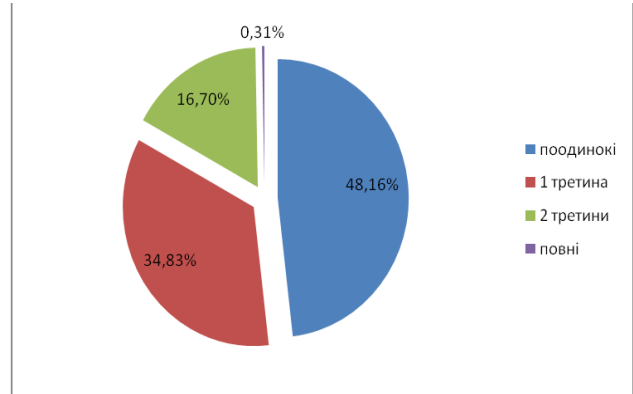


Рис. 4. Розподіл клітин ДНЕС тонкої кишки (у відсотках) залежно від вмісту секреторних гранул на п'яту добу ВОГТКН

ми виявляли гранули зі зниженою щільністю, контури їх мембран втрачали чіткість, виглядали плямистими чи розмитими (рис. 5).

Цілісність мембран окремих гранул порушена, що призводило до можливості виходу секрету в цитоплазму. Канальці ендоплазматичної сітки розширені до величини крупних вакуолей, а кількість рибосом, прикріплених до мембран, зменшена порівняно з контролем, що добре видно на електроннограмах.

Особливо виражене просвітлення матриксу цитоплазми ми спостерігали при інтенсивному розчиненні секреторних гранул, руйнування яких проявлялося у вигляді появи грубої зернистості у вмісті гранул.

Наявність ендокриноцитів з невеликою кількістю гранул і просвітленою цитоплазмою засвідчило про майже повне виведення секрету з клітин. У таких клітинах поодинокі секреторні гранули не завжди давали підставу віднести таку клітину до того чи іншого типу ендокриноцитів.

З боку ядра ми відзначали незначної глибини інвагінації ядерної мембрани, хроматин розташовувався відносно рівномірно, однак по периферії ядра ми спостерігали його концентрацію у вигляді електроннощільних глибок. У деяких клі-

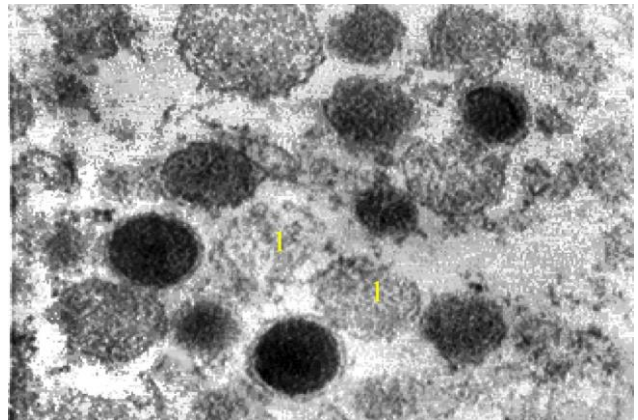


Рис. 5. Ендокриноцит із гранулами зниженої електронної щільності та розмитими краями (1). Електронна мікроскопія. Кишкова непрохідність, 3 доба. $\times 30000$

тинах ми знаходили пікноз ядер та виражену конденсацію хроматину. У таких ділянках скупчення хроматину структура ядерної мембрани мала деструктивно змінений вигляд, пори ядерної оболонки не візуалізувались.

На фоні просвітленого матриксу та вираженої набрякості цитоплазми гладенька ендоплазматична була представлена деструктивно зміненим гранулярним матеріалом та нагромадженнями мембранних структур. Уздовж внутрішньої поверхні клітинної мембрани розташовувались багаточисельні вакуолі з наявністю електронно щільного вмісту. Ці утворення пов'язані з розширеними каналами ендоплазматичної сітки, особливо в ділянці різко вакуолізованих цистерн пластинчатого комплексу.

Місцями цитоплазма виповнена осміофільними частинками і прозорими вакуолями, всередині яких містились шматки мембран, різноманітної форми та щільності гранулярні маси, мієліноподібні структури. Частина вакуолей зливалася, утворюючи характерні порожнини.

У ділянці міжклітинних контактів мав місце

міжклітинний простір, заповнений осміофільними ділянками. У ділянці контактуючих клітин виявлялись пучки тонких фібрилярних структур.

У деяких ділянках ми спостерігали посилення всіх вище перерахованих деструктивних процесів аж до загибелі ендокриноцитів та прилеглих до них епітеліальних клітин.

Висновок. У динаміці розвитку ВГОКН в клітинах дифузної нейроендокринної системи відбуваються деструктивні зміни, які проявляються зменшенням загальної кількості ендокринних клітин та водночас зростанням кількості зруйнованих ендокриноцитів. Ультраструктурні зміни характеризуються порушенням цілісності мембран окремих секреторних гранул з можливістю виходу секрету в цитоплазму, порушенням структури мітохондрій, просвітленням їх матриксу та дезінтеграцією крист.

Перспективи подальших досліджень. У подальшому доцільно визначити фактори, які впливають на зміни морфології ендокриноцитів дванадцятипалої кишки при кишковій непрохідності та їх регенерацію.

Список використаної літератури

1. Lee SP, Lee OY, Lee KN, Lee HL, Choi HS, Yoon BC, Jun DW. Effect of DA-9701, a Novel Prokinetic Agent, on Post-operative Ileus in Rats. *J Neurogastroenterol Motil.* 2017;23(1):109-16. doi: 10.5056/jnm16003.
2. Vilz TO, Stoffels B, Straßburg C, Schild HH, Kalff JC. Ileus in Adults. *Pathogenesis, Investigation and Treatment. Dtsch. Arztebl. Int.* 2017;114(29-30):508-18. doi: 10.3238/arztebl.2017.0508.
3. Дельцова ОІ, Геращенко СБ, Гончар МГ, Скрипко ВД. Реактивні зміни в структурах стінки тонкої кишки при гострій кишковій непрохідності в людини Галицький лікарський вісник. 2012;19(3):122-4.
4. Півторак ВІ, Шапринський ЄВ, Вернигородський СВ. Морфологічні зміни тонкої кишки при експериментальній гострій кишковій непрохідності. *Клінічна анатомія та оперативна хірургія.* 2007;6(2):57-60.
5. Трушенко ОС, Мурзін ОБ, Руденко АІ. Періодична моторно-секреторна діяльність шлунка при дисбалансі його регуляторних механізмів. *Фізіологічний журнал.* 2007;(5):91-8.
6. Багрії ММ, Діброва ВА, Попадинець ОГ, Гришук МІ; *Методики морфологічних досліджень: монографія.* Вінниця: Нова Книга; 2008. – 318 с.

References

1. Lee SP, Lee OY, Lee KN, Lee HL, Choi HS, Yoon BC, et al. Effect of DA-9701, a Novel Prokinetic Agent, on Post-operative Ileus in Rats. *J Neurogastroenterol Motil.* 2017 Jan 30;23(1):109-116. doi: 10.5056/jnm16003.
2. Vilz TO, Stoffels B, Straßburg C, Schild HH, Kalff JC. Ileus in Adults. *Dtsch Arztebl Int.* 2017 Jul 24;114(29-30):508-518. doi: 10.3238/arztebl.2017.0508.
3. Dyel'tsova OI, Herashchenko SB, Honchar MH, Skrypko VD. Reaktyvni zminy v strukturakh stinky tonkoyi kyshky pry hostriy kyshkoviy neprokhidnosti v lyudyny [Reactive changes in the structure of the wall of the colon with acute intestinal obstruction in humans]. *Halyts'kyi likars'kyi visnyk.* 2012;19(3):122-4. (in Ukrainian).
4. Pivtorak VI, Shapryns'kyi YEV, Vernyhorods'kyi SV. Morfolohichni zminy tonkoyi kyshky pry eksperymental'niy hostriy kyshkoviy neprokhidnosti [Morphological changes of the small intestine with experimental acute intestinal obstruction]. *Klinichna anatomiya ta operatyvna khirurgiya.* 2007;6(2):57-60. (in Ukrainian).
5. Trushenko OS, Murzin OB, Rudenko AI. Periodychna motorno-sekretorna diyal'nist' shlunka pry dysbalansi yoho rehulyatornykh mekhanizmiv [Periodic motor-secretory activity of the stomach in the imbalance of its regulatory mechanisms]. *Fiziologichnyy zhurnal.* 2007;(5):91-8. (in Ukrainian).
6. Bahriy MM, Dibrova VA, Popadynets' OH, Hryshchuk MI. Metodyky morfolohichnykh doslidzhen [Methods of morphological research]. *Vinnitsya: Nova Knyha;* 2008. 318 p. (in Ukrainian).

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ДИФFUЗНОЙ НЕЙРОЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМЫ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ ПРИ ОСТРОЙ КИШЕЧНОЙ НЕПРОХОДИМОСТИ

Резюме. В динамике развития высокой обтурационной острой тонкокишечной непроходимости в клетках диффузной нейроэндокринной системы обнаружены деструктивные изменения, которые проявляются уменьшением общего количества эндокринных клеток и одновременно ростом количества разрушенных эндокриноцитов. Ультраструктурные изменения характеризуются нарушением целостности мембран отдельных секреторных гранул с возможностью выхода секрета в цитоплазму, нарушением структуры митохондрий, просветлением их матрикса и дезинтеграцией крист.

Ключевые слова: двенадцатиперстная кишка; острая кишечная непроходимость; диффузная нейроэндокринная система.

ULTRASTRUCTURAL FEATURES OF THE DIFFUSE NEUROENDOCRINE SYSTEM OF THE DUODENUM IN ACUTE INTESTINAL OBSTRUCTION

Abstract. Study of changes in the structure of the duodenal endocrinocytes with intestinal obstruction is a step towards finding out the pathogenesis of the disease. The aim is to establish the ultrastructural features of the diffuse neuroendocrine system of the duodenum in the modeling of high acute obstructive intestinal obstruction. Material and methods. Experimental studies were performed on 20 white mature male rats weighing 300-350 g. Animals were divided into 2 groups: control (5) and experimental (15). Animals of the experimental group were created a model of high acute obstructive intestinal obstruction. Euthanasia was performed by overdose of thiopental sodium at 24, 48 and 72 hours.. Pieces of the duodenum was used for microscopic examination, they were fixed in 10% neutral formalin solution. The preparations were stained by van Gison method, hematoxylin-eosin, for studying endocrinocytes, stained using the Grimmel and Mason-Hamperl method. For electron microscopic examination, the pieces of the duodenum were fixed in a 2.5% solution of glutaraldehyde in 0.1 g phosphate buffer. Results and discussion. Endocrinocytes of the mucous membranes of the small intestine under conditions of high intestinal obstruction above the blockade site differ sharply from similar cells in the villi and crypts of the gut of the animals of the control group. Characteristics of endocrine cells in the content of secretory granules sharply changes. In this group, we observed endocrinocytes whose cytoplasm was slightly saturated with granules up to complete degranulation. The integrity of the membranes of individual granules has been broken, which led to the possibility of secretion in the cytoplasm. Conclusions. In the dynamics of the development of high obstructive acute narrow-hearth obstruction in the cells of the diffuse neuroendocrine system, destructive changes have been identified, which are manifested by a decrease in the total number of endocrine cells and, at the same time, an increase in the number of destroyed endocrinocytes. Ultrastructural changes are characterized by a violation of the integrity of the membranes of the individual secretory granules with the possibility of secretion in the cytoplasm, violation of the structure of mitochondria, illumination of their matrix, and cristae disintegration.

Key words: duodenum, acute intestinal obstruction, diffuse neuroendocrine system.

Відомості про авторів:

Півторак Володимир Ізяславович – доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри клінічної анатомії та оперативної хірургії Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, Вінниця, Україна.

Бурков Микола Валентинович – кандидат медичних наук, доцент кафедри клінічної анатомії та оперативної хірургії Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, Вінниця, Україна.

Information about authors:

Pivtorak Volodymyr Iziaslavovich – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Clinical Anatomy and Operative Surgery, Vinnitsa National Medical University named after M.I. Pirogov, Vinnitsa, Ukraine.

Burkov Mykola Valentinovich – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Clinical Anatomy and Operative Surgery, Vinnitsa National Medical University named after M.I. Pirogov, Vinnitsa, Ukraine.

Надійшла 28.12.2017 р.

Рецензент – проф. Сидорчук Р.І. (Чернівці)