

FEATURES OF THE DISTRIBUTION OF COLLAGEN FIBERS OF THE I-TH AND III-TH TYPES IN THE MESENTERY OF RATS DURING THE FORMATION OF THE ADHESION PROCESS

Zaporizhzhia National University (Zaporizhzhia, Ukraine)

nastasia.p.nikolskaya97@gmail.com

To date, the composites of the small intestinal mesentery adhesion, intercellular interactions, namely lymphocyte-fibroblastic contacts, and patterns of changes in the synthesis of collagen fibres in its composition in the modelling of the adhesive process in comparison with the norm remain not fully understood. The question of the morphology and topography of collagen fibres of the first and third types in the mesentery of the small intestine and their number in the modelling of the adhesion process remains open. The study aimed to identify collagen fibres of the I and III types in the adhesion of the small intestine mesentery, as well as to study their topography and functional activity in the normal state and progressive adhesion. Object and Methods: dissection, macroscopic, microscopic, histological (making film preparations), silver impregnation by Laidlaw method, computer microdensitometry, mathematical (morphometric grid - the number of immunocompetent cells per standard area of 1000 μm^2 was counted), statistical by Student. On the 7th, 14th and 21st day of modelling the adhesion process in rats in the mesentery of the small intestine, an increase in the intensity of collagen formation processes is observed, as indicated by a significant thickening of collagen fibres of the first and third types, as well as an increase in their area by 10,000 μm^2 . In the experimental group, on day 21, the relative area of type III collagen fibres increased to $41.074 \pm 0.07\%$, and type I collagen to $26.123 \pm 0.24\%$ per standard unit of small intestinal mesentery area compared to the intact group (type I collagen - $1.086 \pm 0.03\%$, and type III collagen - $0.74 \pm 0.11\%$ per standard unit of small intestinal mesentery area). Against the background of an increase in the number of lymphocytes per standard unit area of the small intestinal mesentery with progressive processes of adhesion formation, there is an increase in the protein-synthesising function of fibroblasts, which indicates the morphogenetic function of lymphocytes.

Key words: peritoneum, mesentery, adhesive disease, histological changes, collagen fibres, rats, lymphocyte, immunity, morphology.

Connection of the publication with planned research works.

The article is a fragment of the scientific work of the Department of Physiology, Immunology and Biochemistry with the course of Civil Protection and Medicine "Morphological and functional state of organs and their lymphoid components under the influence of internal and external factors" with the state registration number 0123U103988.

Introduction.

The first link in the mechanism of adhesion formation is damage, disruption of peritoneal innervation and trophism, which triggers a cascade of pathogenetic mechanisms. It is known that the peritoneum is damaged by mechanical, thermal, chemical, radioactive damage, as well as inflammation of the peritoneal tissues, bleeding into the abdominal cavity, allergic reactions and ischaemia, as well as physiological processes of ageing. A decrease in the functioning of the autonomic nervous system affects the functional state of the intestine [1].

In 1989, scientists found that the damaged area of the peritoneum was covered with a thin layer of fibrin. The great omentum moves towards the destruction of the peritoneum and produces mesotheliocytes that cover the entire peritoneal defect with fibrin formations [2]. The mesothelial layer is regenerated by mesothelial cells, which regenerate rapidly. After that, the fibrin effusion forms into connective tissue – a mesothelial-covered scar or adhesion occurs [3].

The morphological substrate of the adhesion is polymorphonuclear leukocytes, activated macrophages and mast cells, accumulation of oxygen free radicals, inflammatory mediators and other biologically active substances, and collagen fibres synthesised by fibroblasts. The

trigger for collagenogenesis is hypoxia, which develops due to impaired microcirculation in the peritoneum. Hypoxia stimulates fibroblasts, which begin to synthesise collagen. The process of adhesion formation lasts 3-4 months, and adhesions can be vascularised, innervated and covered with mesothelium [4].

Thin collagen fibres are found between the fibrin filaments along with fibroblasts, which are initially located randomly, but as the adhesions stretch, a histological adaptation of the fibrous structure occurs. The fibres quickly arrange themselves according to the original location [5].

To understand the process of forming a link between the innate and adaptive immunity of the abdominal cavity, the structure and organization of the tissue barrier between the intestine and the abdominal cavity as a dynamic structure remains poorly understood. The composites of the small intestinal mesentery adhesion, intercellular interactions, namely lymphocyte-fibroblastic contacts, and patterns of changes in the synthesis of collagen fibres in its composition when modelling the adhesive process in comparison with the norm remain not fully understood.

The quantitative and qualitative composition of collagen formations in the normal state and cases of changes in the reactivity of the lymphoid component of the small intestinal mesentery tissue have not been sufficiently studied.

The question of the morphology and topography of collagen fibres of the first and third types in the mesentery of the small intestine, their number in the modelling of the adhesive process remains open.

The aim of the study.

Detection of collagen fibres of types I and III in the adhesion of the small intestine mesentery, study of their topography and functional activity in normal and progressive adhesion.

Object and research methods.

The study involved 20 animals divided into two groups: Group I (n=5) – intact and Group II – experimental (n=15). To simulate the adhesion process, the animals were injected with 0.5 ml of a 20% talcum powder suspension (ChemSale) [6].

On days 7, 14, and 21, animals of the second experimental group were withdrawn from the experiment by anaesthesia. Necropsy and sampling of material for further studies were performed under anaesthesia in compliance with the standards of the Council of Europe Convention on Bioethics of 1997, the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes, and the general ethical principles of animal experimentation approved by the First National Congress of Ukraine on Bioethics [7].

The degree of adhesions between the organs and peritoneal walls, as well as their morphology and topography, was assessed by the macroscopic method.

For histological evaluation, fragments of small intestinal mesentery tissue (15 x 15 mm) were taken and film histological preparations were made. To prevent twisting of the film material, the collected samples were placed on foam rubber sides and fixed in 10% neutral formalin [8].

Silver impregnation was performed on film preparations of small intestinal mesentery tissues using the Laidlaw method: collagen fibres of type I were golden brown and type III were black to study the peculiarities of collagen expression during adhesion formation.

The film preparations were examined by light microscopy, with accompanying microphotography of samples from each group, using a MICROMed Evolution LUM LS-8530 microscope.

The collagen fibres of the first and third types were calculated per standard unit area of small intestinal mesentery tissue by computer microdensitometry using digital images and ImageJ software. The results were processed by statistical processing methods according to the Student's criterion using Microsoft Excel with a confidence level of at least 95% ($p < 0.05$).

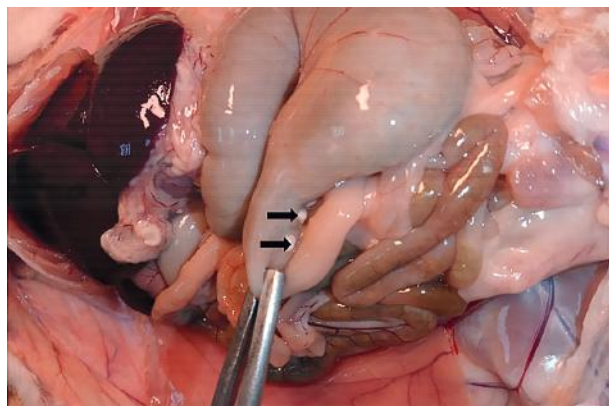


Figure 1 – Detection of adhesions in the mesentery of the intestine in rats on day 14 after administration of talc suspension. Macroscopic specimen.

Research results and their discussion.

An experimental model of the adhesive process according to Volyanska A.G. (2012) was used, which ensures the formation of dense fibrin structures within three weeks of observation: on day 7, the presence of whitish structures on the surface of the studied tissue is observed; on day 14, they take the form of thin elastic scales; on day 21, they appear as dense cartilage-like conglomerates (fig. 1).

In animals of the first intact group, collagen fibres, when detected by Laidlaw silver nitric acid impregnation, are long, predominantly linear in structure, among which there are also tortuous forms, up to 4-6 μm thick. Quite often, they form bundles tightly adjacent to each other. The area of type I collagen fibres in the intact group is $214.047 \pm 0.72 \mu\text{m}^2$. The index of their relative area is $1.086 \pm 0.03\%$ per standard unit of small intestinal mesentery area. When studying the expression of type III collagen in the mesentery of the small intestine of the first intact group of animals, thin and delicate structures were observed, compared with type I collagen fibres. They can be characterised as slightly tortuous, 1-2 μm thick, and of a deep black colour. They are located radially in the thickness of the mesenteric tissue. They are localised mainly around the vessels, forming a pattern of small loops. In some places, the presence of type I and type III fibres located in relative proximity to each other is noted (fig. 2a). The area of collagen fibres of type III in the intact group was determined to be $224.897 \pm 0.46 \mu\text{m}^2$ with a relative area of the studied structures of $0.74 \pm 0.11\%$ per standard unit of the area of the mesentery of the small intestine.

On the 7th day of the study, in animals of the experimental group, it was found that the expression of type I collagen increased in the tissues of the mesentery of the small intestine compared to animals of the intact group, which is expressed in the compaction of collagen filaments. The thickness of the structures varies between 4-6 μm . Individual fibres are almost indistinguishable. It was noted that the type I collagen acquired a darker colour. Its area is $215.786 \pm 0.44 \mu\text{m}^2$ with a relative area index of $1.725 \pm 0.12\%$ per standard unit of small intestinal mesentery area. The microscopic specimen also shows collagen fibres of type III, which look like wavy fibres that merge with each other. There is a darkening of their colour compared to the results of the intact group of animals (fig. 2b). The tortuosity of individual structures is preserved. The thickness of the fibres is constant and reaches 2 μm . In the experimental group of animals, there is a gradual increase in the area of collagen fibres of type III to $232.965 \pm 0.58 \mu\text{m}^2$, and the relative area index increases with it, $4.066 \pm 0.03\%$ per standard unit of the area of the small intestinal mesentery.

On the 14th day of the study, the animals of the experimental group showed uneven thickening and noticeable coarsening of type I collagen fibres, compared with the results of the study of the intact group and the data on the 7th day of adhesion formation. The fibres are characterised by a dark brown colour. Their thickness increases to 8 μm . The lines of their dense structures become straight. No tortuosity is observed (fig. 2c). The area of collagen type I shows a tendency to increase and is $223.383 \pm 0.43 \mu\text{m}^2$. The index of the relative area of type I collagen fibres also increased to $17.977 \pm 0.08\%$ per standard unit of small intestinal mesentery area.

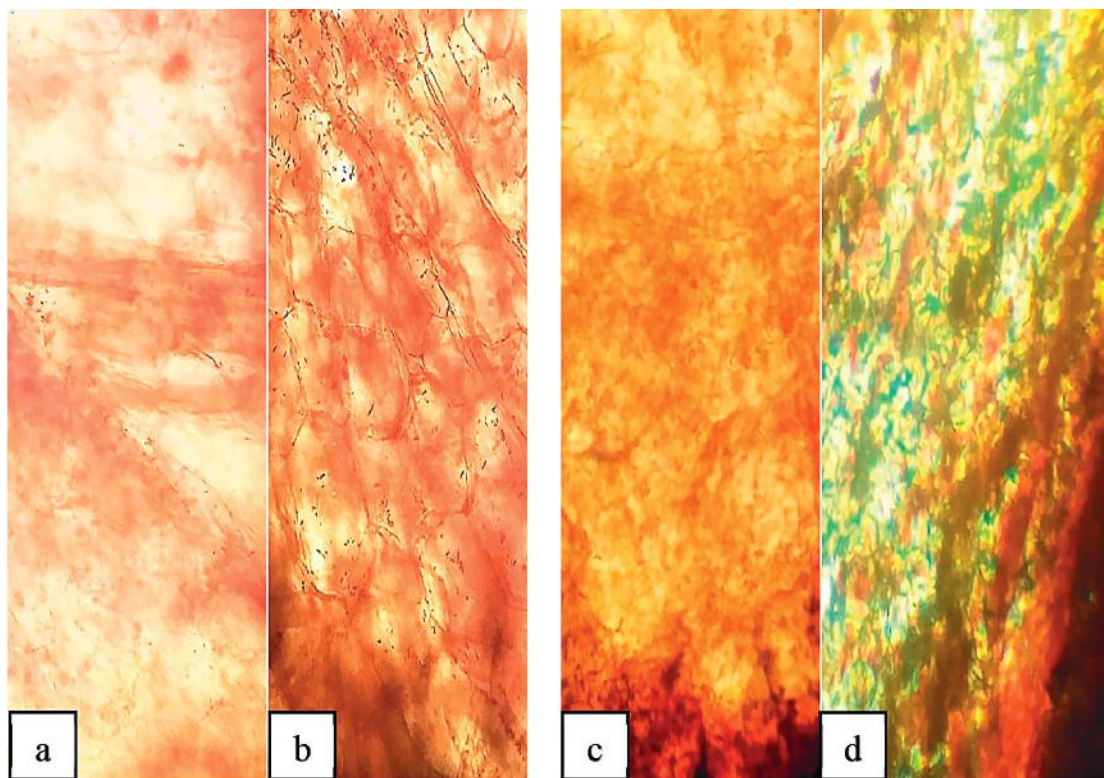


Figure 2 – Film preparation of rat mesentery. Detection and accumulation of collagen fibres of types I and III: a) normal; b) on day 7; c) on day 14; d) on day 21 of the adhesion process modelling. Laidlaw silver nitric acid impregnation after mesothelium desquamation with trypsin. Magnification: $\times 100$.

There is a noticeable thickening and compaction of collagen fibres of type III, compared with the results of the intact group of animals and the data on day 7 of the study. The thickness is $4\text{ }\mu\text{m}$. In the mesentery of the small intestine, black fibres form a looped pattern. The structures under study are connected to each other by wavy fibres. The area of type III collagen at this time of observation of the adhesion process increased to $234.702 \pm 0.44\text{ }\mu\text{m}^2$. The relative area index increased to $18.379 \pm 0.06\%$ per standard unit of small intestinal mesentery area.

On day 21 of the study, animals of the second experimental group showed coarsening of type I collagen fibres, expressed in an increase in their density and thickening of fibrous structures (up to $9\text{--}10\text{ }\mu\text{m}$). The boundary of the fibres becomes less contoured due to the layering of different components of the adhesion. They acquire a vectorial orientation. The colour of the tested components acquires an intense dark brown hue. The fibres are placed in thick, straight lines without branches along the blood vessels. At this observation period, an increase in the area of type I collagen fibres to $251.949 \pm 0.50\text{ }\mu\text{m}^2$ was observed. It was found that type I collagen occupies a relative area of $41.074 \pm 0.07\%$ per standard unit of small intestinal mesentery area. Also, there is an increased expression of type III collagen fibres compared to the results of the previous study periods. Significant thickening and coarsening of these fibres were observed. The thickness of black fibrous structures is $4\text{--}5\text{ }\mu\text{m}$. In some places, their fragmentation and splitting are observed. The fibres look like short, uneven ribbons (fig. 2d). The area of type III collagen at this time of observation was $235.607 \pm 0.38\text{ }\mu\text{m}^2$. The relative area of collagen fibres of type III increased to $26.123 \pm 0.24\%$ per standard unit of small intestinal mesentery area.

Scientists have previously proved the role of connective tissue remodelling factor and its participation in the formation of adhesions [9]. It is important to consider the factor of morphogenetic function of lymphocytes on the functional activity of fibroblasts according to the concept of Professor Voloshin M.A. (2015) [10].

At the histological level, the structure of adhesions is represented by fibroblasts, lymphocytes, vascular endothelial cells, mesotheliocytes, and collagen fibres. All components are in a particular ratio [11].

It has been established that the process of adhesion formation is accompanied by dynamic correlating changes in the number of fibroblasts and lymphocytes and their intercellular contacts (fig. 3).

Thus, in the second experimental group of the study, the presence of elongated spindle-shaped cells up to $10\text{ }\mu\text{m}$ long – fibroblasts – was observed. On the 14th and

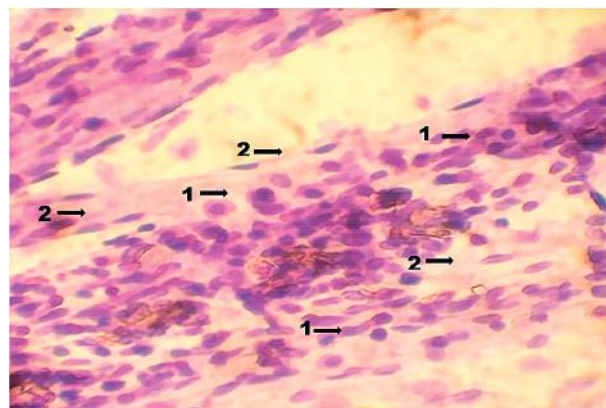


Figure 3 – Small intestinal mesentery on day 14 of adhesion formation. Film preparation. Staining: haematoxylin and eosin. Embedded in Canadian balsam. Magnification: $\times 100$. Designations: 1 – lymphocytes; 2 – fibroblasts.

21st day of the adhesion process, a tendency to increase their number throughout the studied area of the mesentery of the small intestine was visually observed.

In the first intact group, lymphocytes are mainly diffuse. In the second group, they are arranged in groups of 5-7 cells, corresponding to the classical structure of lymphoid tissue associated with serous membranes SALC (serosa-associated lymphoid clusters). They are characterised as rounded small cells up to 8-9 μm in diameter with distinct nuclei. Some of them have a wide cytoplasmic rim. The number of lymphocytes in the mesentery of the small intestine increases on day 14 – by 30% of the group and on day 21 – by 36% in animals of the second experimental group, compared to the data of the first intact group, which we obtained in previous studies.

Previous studies have described the macroscopic structure of adhesions at each time point of the modelling of the adhesive process [12]. Based on the previously obtained data and the results of microscopic studies, we have identified the peculiarities of histological changes in the tissues of the mesentery of the small intestine in rats during the adhesive process.

On the 7th day of simulating the adhesive process in rats, the intensity of collagen formation processes tends to increase. In the experimental group of animals, a gradual increase in the relative area of collagen fibres of the first and third types was observed during all observation periods.

The biological tissue barrier of the abdominal cavity is formed at the cellular and molecular level. Exposure to antigens leads to the activation of both B_1 and B_2 lymphocytes, which synthesise weak specific immunoglobulins of class M that do not penetrate the tissue barrier. It is also likely that the B_2 immune system is activated, leading to the deposition of immune complexes. An increase in the number of lymphocytes increases the synthetic function of fibroblasts. This leads to excessive deposition of fibrin complexes. An increase in the func-

tional activity of fibroblasts leads to an increase in the synthesis of collagen and other connective tissue matrix components [13]. Biologically active substances affect synthetic processes, which explains the morphogenetic function of lymphocytes [14].

It is known that connective tissue contains the enzyme collagenase, which automatically regulates collagen synthesis and breakdown. Macrophages play an important role in this synthesis. A prerequisite for developing macrophages' properties for active collagenase synthesis is their contact with T lymphocytes, which are potent regulators of fibrillation, which will be the aim of further research [15].

Conclusions.

1. On the 7th, 14th and 21st day of modelling the adhesion process in rats, an increase in the intensity of collagen formation processes was observed in the mesentery of the small intestine, as indicated by a significant thickening of collagen fibres of the first and third types, as well as an increase in their area by 10,000 μm^2 . In the experimental group, on day 21, the relative area of type III collagen fibres increased to $41.074 \pm 0.07\%$, and type I collagen to $26.123 \pm 0.24\%$ per standard unit area of the small intestinal mesentery compared to the intact group (type I collagen – $1.086 \pm 0.03\%$, and type III collagen – $0.74 \pm 0.11\%$ per standard unit area of the small intestinal mesentery).

2. Against the background of an increase in the number of lymphocytes per standard unit area of the small intestinal mesentery with progressive processes of adhesion formation, there is an increase in the protein-synthesising function of fibroblasts, indicating the morphogenetic function of lymphocytes.

Prospects for further research.

Study the topography and number of macrophages, which play an important role in synthesising collagenase, in the mesentery of rats' small intestine in normal and adhesive processes.

DOI 10.29254/2077-4214-2024-2-173-391-399

УДК 57.085:[599.323.452:591.438]

Пайдаркіна А. П., Куц О. Г.

ОСОБЛИВОСТІ РОЗПОДІЛУ КОЛАГЕНОВИХ ВОЛОКОН I-ГО ТА III-ГО ТИПІВ В БРИЖІ КИШКІВНИКА ЩУРІВ ПІД ЧАС ФОРМУВАННЯ СПАЙКОВОГО ПРОЦЕСУ

Запорізький національний університет (м. Запоріжжя, Україна)

nastasia.p.nikolskaya97@gmail.com

До теперішнього часу не до кінця вивченими залишаються композити спайки брижі тонкої кишки, міжклітинні взаємодії, а саме лімфоцитарно-фібробластичні контакти, та закономірності змін синтезу колагенових волокон в його складі при моделюванні спайкового процесу в порівнянні з нормою. Залишається також відкритим питання морфології і топографії колагенових волокон I-го і III-го типів в брижі тонкої кишки, їх кількості при моделюванні спайкового процесу. Метою дослідження стало виявлення колагенових волокон I-го та III-го типів у складі спайки брижі тонкої кишки, дослідження їх топографії та функціональної активності в нормі та при прогресуючому спайкоутворенні. Об'єкт і методи: препарування, макроскопічний, мікроскопічний, гістологічний (виготовлення плівкових препаратів), імпрегнація сріблом за методикою Лейдлоу, комп'ютерна мікроденситометрія, математичний (морфометрична сітка - підраховувалася кількість імунокомпетентних клітин на стандартну площу 1000 μm^2), статистичний за Стьюдентом. На 7-у, 14-у і 21-у добу моделювання спайкового процесу у щурів в брижі тонкої кишки спостерігається зростання інтенсивності процесів колагеноутворення, на що вказує значне потовщення колагенових волокон I-го і III-го типів, а також зростання їх площі на 10000 μm^2 . В експериментальній групі на 21-у добу показник відносної площі колагенових волокон III-го типу збільшується до $41,074 \pm 0,07\%$, а колагену I-го типу до $26,123 \pm 0,24\%$ на стандартну одиницю площі брижі тонкої кишки у порівнянні з інтактною групою (колаген I-го типу – $1,086 \pm 0,03\%$, а колаген III-го типу – $0,74 \pm 0,11\%$ на стандартну

одинацьку площі брижі тонкої кишки). На тлі збільшення кількості лімфоцитів на стандартну одиницю площі брижі тонкої кишки при прогресуючих процесах спайкоутворення відбувається зростання білок-синтезуючої функції фібробластів, що вказує на морфогенетичну функцію лімфоцитів.

Ключові слова: очеревина, брижа, спайкова хвороба, гістологічні зміни, колагенові волокна, щури, лімфоцит, імунітет, морфологія.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Стаття є фрагментом наукової роботи кафедри фізіології, імунології і біохімії з курсом цивільного захисту та медицини «Морфо-функціональний стан органів і їх лімфоїдних компонентів під дією внутрішніх і зовнішніх факторів» з номером державної реєстрації 0123U103988.

Вступ.

Першою ланкою механізму утворення спайок є ушкодження, порушення іннервації та трофіки очеревини, що запускає каскад патогенетичних механізмів. Відомо, що до пошкодження очеревини призводить її механічне, термічне, хімічне, радіоактивне ушкодження, а також запалення тканин очеревини, кровотеча в черевну порожнину, алергічні реакції та ішемія, а також фізіологічні процеси старіння. Зниження функціонування вегетативної нервової системи впливає на функціональний стан кишківника [1].

У 1989 р. науковцями було встановлено, що пошкоджена ділянка очеревини покривається тонким шаром фібрину. Великий сальник переміщується у бік деструкції очеревини та продукує мезотеліоцити, які покривають фібриновими утвореннями вздовж усього дефекту очеревини [2]. Мезотеліальний шар регенерується за рахунок мезотеліоцитів, які швидко регенеруються. Після цього випіт фібрину формується в сполучну тканину – виникає рубець, покритий мезотелієм, або спайка [3].

Морфологічним субстратом спайки є поліморфноядерні лейкоцити, активовані макрофаги і тучні клітини, нагромадження вільних радикалів кисню, медіаторів запалення та інших біологічно активних речовин, а також колагенові волокна, що синтезуються фібробластами. Пусковим механізмом колагеногенезу є гіпоксія, що розвивається у зв'язку з порушенням мікроциркуляції у очеревині. Гіпоксія стимулює фібробласти, які починають синтезувати колаген. Процес спайкоутворення триває 3-4 місяці, при цьому спайки можуть васкуляризуватися, іннервуватися та покриватися мезотелієм [4].

Між нитками фібрину поряд з фібробластами виявляються тонкі колагенові волокна, які спочатку розташовані безсистемно, але в міру розтягування спайок відбувається гістологічна акомодация волокнистої конструкції і волокна швидко розташовуються відповідно вихідного розташування [5].

Для розуміння процесу формування зв'язку між вродженим і адаптивним імунітетом черевної порожнини залишається мало дослідженим питання будови і структури тканинного бар'єру між кишківником і абдомінальною порожниною, як динамічної структури. До теперішнього часу не до кінця вивченими залишаються композити спайки брижі тонкої кишки, міжклітинні взаємодії, а саме лімфоцитарно-фібробластичні контакти, та закономірності змін синтезу колагенових волокон в його складі при моделюванні спайкового процесу в порівнянні з нормою.

Недостатньо досліджене питання кількісного і якісного складу колагенових утворень в нормі і при змінах реактивності лімфоїдного компоненту тканини брижі тонкої кишки.

Залишається також відкритим питання морфології і топографії колагенових волокон I-го і III-го типів в брижі тонкої кишки, їх кількості при моделюванні спайкового процесу.

Мета дослідження.

Виявлення колагенових волокон I-го та III-го типів у складі спайки брижі тонкої кишки, дослідження їх топографії та функціональної активності в нормі та при прогресуючому спайкоутворенні.

Об'єкт і методи дослідження.

У дослідженні брали участь 20 тварин, яких було поділено на дві групи: I-у (n=5) – інтактну і II-у – експериментальну (n=15). Для моделювання спайкового процесу тваринам вводили 0,5 мл 20% суспензії тальку (ХімСейл) [6].

На 7-у, 14-у і 21-у добу тварини II-ої експериментальної групи виводили з експерименту шляхом наркозування. Розтин і забір матеріалу для подальших досліджень виконувалися в умовах анестезії з дотриманням нормативів Конвенції з біоетики Ради Європи 1997 року, Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики [7].

Макроскопічним методом оцінювали ступінь утворення спайок між органами та стінками очеревини, а також їх морфологію і топографію.

Для гістологічної оцінки забирали фрагменти тканини брижі тонкої кишки розміром 15 x 15 мм і виготовляли плівкові гістологічні препарати. Для запобігання скручуванню плівкового матеріалу зібрані зразки розміщували на бортиках з поролону і фіксували в 10% нейтральному формаліні [8].

Для вивчення особливостей експресії колагенів при спайкоутворенні проводили імпрегнацію сріблом на плівкових препаратах тканин брижі тонкої кишки за методикою Лейдлоу: волокна колагену I-го типу золотисто-коричневого кольору і III-го типу чорного кольору.

Плівчасні препарати досліджувалися методом світлової мікроскопії із супутнім мікрофотографуванням зразків кожної групи на мікроскопі MICROmed Evolution LUM LS-8530.

Площу колагенових волокон I-го і III-го типів підраховували на стандартну одиницю площі тканини брижі тонкої кишки методом комп'ютерної мікроденситометрії, із використанням цифрових зображень і програмного забезпечення ImageJ. Отримані результати оброблялися методами статистичної обробки за критерієм Стюдента із використанням Microsoft Excel з рівнем достовірності не менше 95% (p<0,05).

Результати дослідження та їх обговорення.

Задіяна експериментальна модель спайкового процесу за Волянською А.Г. (2012), що забезпечує утворення щільних фібринових структур протягом трьох тижнів спостереження: на 7-у добу спостерігається наявність білуватих структур на поверхні досліджуваної тканини; на 14-у добу вони набувають форми тонких еластичних лусочок; на 21-у добу виявляються у вигляді щільних хрящеподібних конгломератів (рис. 1).

У тварин I-ї інтактної групи колагенові волокна, при їх виявленні імпрегнацією азотнокислим сріблом за Лейдлоу, довгі, переважно лінійної структури, серед яких зустрічаються і звивисті форми, товщиною до 4-6 мкм. Доволі часто вони утворюють пучки, щільно прилягаючи одне до одного. Площа волокон колагену I-го типу в інтактній групі складає $214,047 \pm 0,72$ мкм². Показник їх відносної площі – $1,086 \pm 0,03\%$ на стандартну одиницю площі брижі тонкої кишки. При дослідженні експресії колагену III-го типу в брижі тонкої кишки I-ї інтактної групи тварин відмічено тонкі і ніжні структури, в порівнянні з колагеновими волокнами I-го типу. Їх можна охарактеризувати як злегка звивисті, товщиною 1-2 мкм, насиченого чорного кольору. Розташовані радіально в товщі тканини брижі. Локалізуються переважно навколо судин, утворюючи візерунок з дрібних петель. Подекуди відмічається наявність волокон I-го і III-го типу розташованих у відносній близькості один з одним (рис. 2а). Встановлено площу колагенових волокон III-го типу в інтактній групі – $224,897 \pm 0,46$ мкм² при відносній площі досліджуваних структур $0,74 \pm 0,11\%$ на стандартну одиницю площі брижі тонкої кишки.

На 7-у добу дослідження у тварин експериментальної групи виявлено, що в тканинах брижі тонкої кишки зростає експресія колагену I-го типу, в порівнянні з тваринами інтактної групи, що виражається в ущільненні ниток колагену. Товщина структур коливається в межах 4-6 мкм. Окремі волокна майже не розрізняються. Відмічено, що колаген I-го типу набув більш темнішого забарвлення. Його площа складає $215,786 \pm 0,44$ мкм² при показнику відносної площі $1,725 \pm 0,12\%$ на стандартну одиницю площі брижі тонкої кишки. У мікропрепараті також спостерігаються колагенові волокна III-го типу, що мають вигляд хвилястих волокон, які зливаються одна з одною. Відмічається потемніння їх забарвлення, у порівнянні з результатами інтактної групи тварин

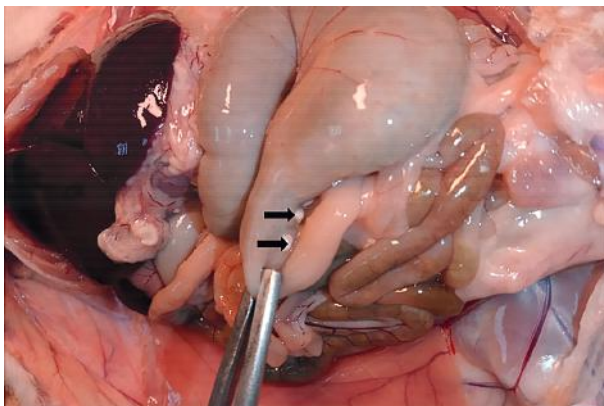


Рисунок 1 – Виявлення спайок в брижі кишківника у щурів на 14-у добу після введення суспензії тальку. Макроскопічний препарат.

(рис. 2б). Зберігається звивистість окремих структур. Товщина волокон є сталою і сягає до 2 мкм. В експериментальній групі тварин відзначається поступове збільшення площі колагенових волокон III-го типу до $232,965 \pm 0,58$ мкм², разом з нею зростає і показник відносної площі $4,066 \pm 0,03\%$ на стандартну одиницю площі брижі тонкої кишки.

На 14-у добу дослідження у тварин експериментальної групи встановлено нерівномірне потовщення і помітне огрубіння колагенових волокон I-го типу, в порівнянні з результатами дослідження інтактної групи і даними на 7-у добу спайкоутворення. Волокна характеризуються темно-коричневим забарвленням. Їх товщина збільшується до 8 мкм. Лінії їх щільних структур набувають прямолінійний характер. Звивистості не спостерігається (рис. 2в). Площа колагену I-го типу проявляє тенденцію до збільшення і дорівнює $223,383 \pm 0,43$ мкм². Показник відносної площі колагенових волокон I-го типу також збільшився до $17,977 \pm 0,08\%$ на стандартну одиницю площі брижі тонкої кишки. Відмічається помітне потовщення і ущільнення колагенових волокон III-го типу, у порівнянні з результатами інтактної групи тварин і даними на 7-у добу дослідження. Товщина складає 4 мкм. В брижі тонкої кишки чорні волокна утворюють петлеподібний малюнок. Досліджувані структури хвилястими волокнами поєднуються одна з одною. Площа колагену III-го типу на даному терміні спостереження спайкового процесу збільшилася до $234,702 \pm 0,44$ мкм². Показник відносної площі збільшився до $18,379 \pm 0,06\%$ на стандартну одиницю площі брижі тонкої кишки.

На 21-у добу дослідження у тварин II-ї експериментальної групи спостерігається огрубіння колагенових волокон I-го типу, що виражається у збільшенні їх щільності і потовщеності волокнистих структур (до 9-10 мкм). Межа волокон стає менш контурованою через нашарування різних компонентів спайки, вони набувають векторної спрямованості. Забарвлення досліджуваних компонентів набуває інтенсивного темного коричневого відтінку. Волокна розміщуються товстими і прямими лініями без розгалужень вздовж кровоносних судин. На даному терміні спостереження спостерігається збільшення площі колагенових волокон I-го типу до $251,949 \pm 0,50$ мкм². Встановлено, що колаген I-го типу займає відносну площу $41,074 \pm 0,07\%$ на стандартну одиницю площі брижі тонкої кишки. Також, спостерігається посилення, у порівнянні з результатами попередніх термінів дослідження, експресія колагенових волокон III-го типу. Помічено значне їх ущільнення і огрубіння. Товщина чорних волокнистих структур складає 4-5 мкм. Місцями спостерігається їх фрагментація і розщеплення. Волокна мають вигляд коротких, нерівномірних по товщині стрічков (рис. 2г). Площа колагену III-го типу на даному терміні спостереження складала $235,607 \pm 0,38$ мкм². Показника відносної площі колагенових волокон III-го типу збільшується до $26,123 \pm 0,24\%$ на стандартну одиницю площі брижі тонкої кишки.

Вченими раніше була доведена роль фактору ремоделювання сполучної тканини та її участь у формуванні спайок [9]. Важливо врахувати фактор морфогенетичної функції лімфоцитів на функцію-

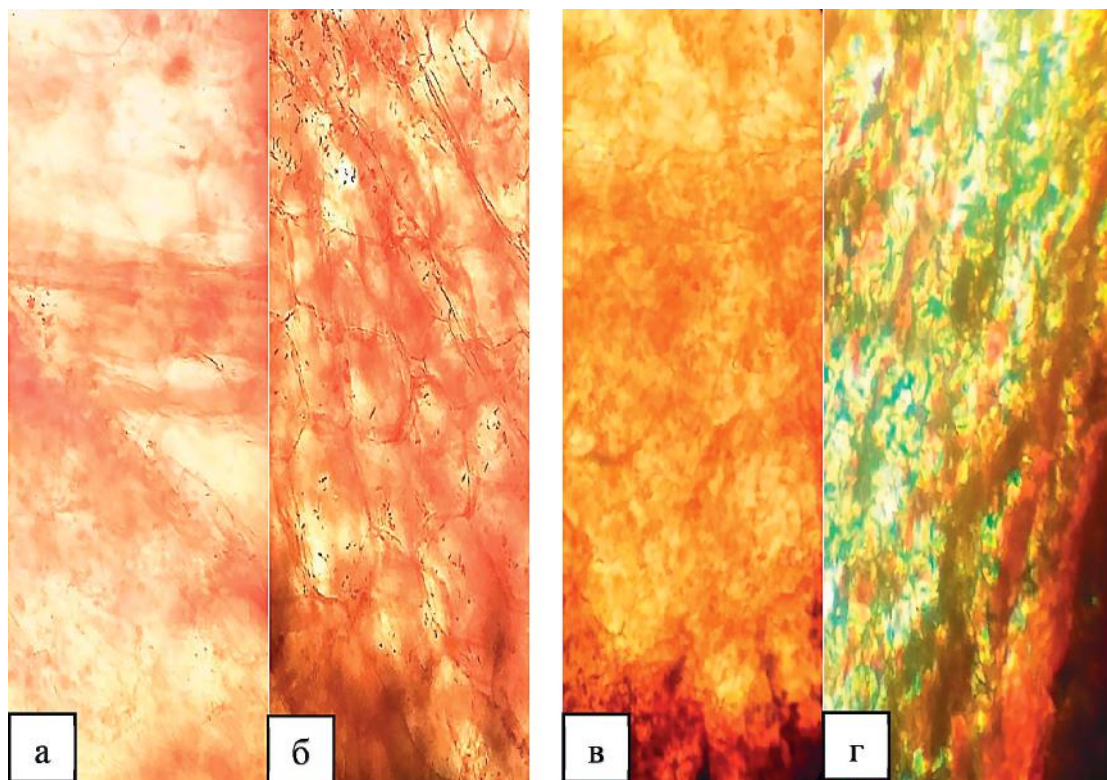


Рисунок 2 – Плівчастий препарат брижі щурів. Виявлення і накопичення колагенових волокон I-го і III-го типів: а) в нормі; б) на 7-у добу; в) на 14-у добу; г) на 21-у добу моделювання спайкового процесу. Імпрегнація азотнокислим сріблом за Лейдлоу після десквамації мезотелію трипсином. 36.: $\times 100$.

нальну активність фібробластів за концепцією професора Волошина М.А. (2015) [10].

На гістологічному рівні структура спайок представлена фібробластами, лімфоцитами, ендотеліальними клітинами судин, мезотеліоцитами, а також колагеновими волокнами. Всі компоненти знаходяться у певному співвідношенні [11].

Встановлено, що процес формування спайок супроводжується динамічними корелюючими змінами чисельності фібробластів і лімфоцитів та їх міжклітинними контактами (рис. 3).

Так, в II-й експериментальній групі дослідження спостерігається наявність витягнутих веретеноподібних клітин, довжиною до 10 мкм – фібробластів. На 14-у і 21-у добу спайкового процесу, візуально, відмічається тенденція до збільшення їх кількості по всій досліджуваній площі брижі тонкої кишки.

В I-й інтактній групі лімфоцити розташовані переважно дифузно, а в II-й розташовані групами по 5-7 клітин, що відповідає класичній будові лімфоїдної тканини, асоційованої з серозними оболонками SALC (serosa – associated lymphoid clusters). Вони характеризуються як округлі невеликі клітини діаметром до 8-9 мкм з чіткими ядрами. Деякі з них з широким обідком цитоплазми. Кількість лімфоцитів в брижі тонкої кишки зростає: на 14-у добу – на 30% групи та на 21-у добу – на 36% у тварин II-ї експериментальної групи, порівняно з даними I-ї інтактної групи, що було отримано нами в попередніх дослідженнях.

В попередніх роботах було описано макроскопічну будову спайок на кожному терміні моделювання спайкового процесу [12]. Спираючись на раніше отримані дані і результати мікроскопічних досліджень, виявлено особливості гістологічних змін тканин брижі тонкої кишки у щурів при спайковому процесі.

На 7-у добу моделювання спайкового процесу у щурів помітна тенденція до зростання інтенсивності процесів колагеноутворення. В експериментальній групі тварин відзначається поступове збільшення відносної площі колагенових волокон I-го і III-го типів протягом усіх періодів спостереження.

Біологічний тканинний бар'єр черевної порожнини формується на клітино-молекулярному рівні. Вплив антигенів призводить до активації як B_1 – так і B_2 -лімфоцитів, які синтезують слабкі специфічні імунoglobulini класу M, що не проникають через тканинний бар'єр. Також, ймовірно, активується B_2 -ланка імунітету, що також призведе до відкладання імунних комплексів. Збільшення кількості лімфоцитів підвищує синтетичну функцію фібробластів. Це призводить до надлишкового відкладання фібринових комплексів. Зростання функціональної активності

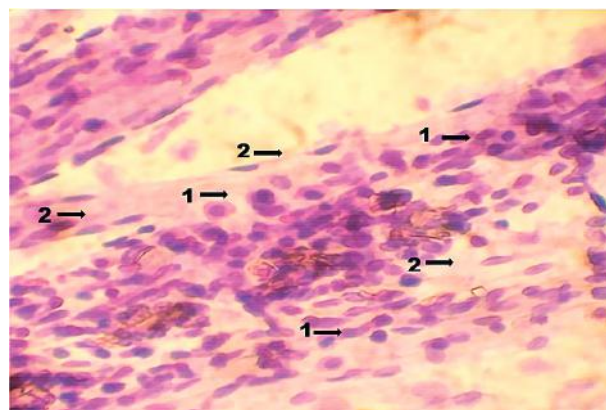


Рисунок 3 – Брижа тонкої кишки на 14-у добу спайкоутворення. Плівчастий препарат. Забарвлення: гематоксилін і еозин. Заключення в канадський бальзам. 36.: $\times 100$. Позначення: 1 – лімфоцити; 2 – фібробласти.

фіброblastів призводить до збільшення синтезу колагену та інших компонентів сполучнотканинного матриксу [13]. Біологічно активні речовини чинять дію на синтетичні процеси, що і пояснює морфогенетичну функцію лімфоцитів [14].

Відомо, що у сполучній тканині міститься автоматична регуляція синтезу та розпаду колагену ферментом колагеназою. Макрофаги відіграють важливу роль у їх синтезі. Необхідною умовою для розвитку властивостей макрофагів до активного синтезу колагенази є їх контакт з Т-лімфоцитами, які є потужними регуляторами фібриляції, що стане метою подальших наукових досліджень [15].

Висновки.

1. На 7-у, 14-у і 21-у добу моделювання спайкового процесу у щурів в брижі тонкої кишки спостерігається зростання інтенсивності процесів колагенотворення, на що вказує значне потовщення колагенових волокон I-го і III-го типів, а також зростання їх площі

на 10000 мкм². В експериментальній групі на 21-у добу показник відносної площі колагенових волокон III-го типу збільшується до 41,074±0,07%, а колагену I-го типу до 26,123±0,24% на стандартну одиницю площі брижі тонкої кишки у порівнянні з інтактною групою (колаген I-го типу – 1,086±0,03%, а колаген III-го типу – 0,74±0,11% на стандартну одиницю площі брижі тонкої кишки).

2. На тлі збільшення кількості лімфоцитів на стандартну одиницю площі брижі тонкої кишки при прогресуючих процесах спайкоутворення відбувається зростання білок-синтезуючої функції фіброblastів, що вказує на морфогенетичну функцію лімфоцитів.

Перспективи подальших досліджень.

Дослідження топографії і кількості макрофагів, які відіграють важливу роль у синтезі колагенази, в брижі тонкої кишки у щурів в нормі і при спайковому процесі.

References / Література

1. Fatehi Hassanabad A, Zarzycki AN, Jeon K, Deniset JF, Fedak PWM. Post-Operative Adhesions: A Comprehensive Review of Mechanisms. *Biomedicines*. 2021;9(8):867.
2. Shenkin A, Fraser WD, Series J, Winstanley FP, McCartney AC, Burns HJ, et al. The serum interleukin 6 response to elective surgery. *Lymphokine Res*. 1989;8:123–127.
3. Fischer A, Koopmans T, Ramesh P, Christ S, Strunz M, Wannemacher J, et al. Post-surgical adhesions are triggered by calcium-dependent membrane bridges between mesothelial surfaces. *Nat. Commun*. 2020;11:3068.
4. Foster DS, Marshall CD, Gulati GS, Chinta MS, Nguyen A, Salhotra A, et al. Elucidating the fundamental fibrotic processes driving abdominal adhesion formation. *Nat. Commun*. 2020;11:4061.
5. Wang Q, Huang Y, Zhou R, Wu K, Li W, Shi L, et al. Regulation and function of IL-22 in peritoneal adhesion formation after abdominal surgery. *Wound Repair Regen*. 2020;28:105–117.
6. Volyans'ka AG, Syvokonyuk OV. Porivnyal'nyy analiz vplyvu sul'fatubariyu ta tal'ku na intensyvnyy spaykovohy protsesy u samostiynykh bilykh shchuriv. *Intehratyvna antropohiya*. 2012;1(19):58–61. [in Ukrainian].
7. Bénézec C, Jackson-Jones LH. ILC2 Orchestration of Local Immune Function in Adipose Tissue. *Front. Immunol*. 2019;10:171–176.
8. Paidarkina AP, Kushch OG. Vychennya morfolohichnykh osoblyvostey ocherevyyny bilykh shchuriv ta metodu yiyi zaboru. *Morfolohiya*. 2023;17(3):163–168. [in Ukrainian].
9. Terri M, Trionfetti F, Montaldo C, Cordani M. Mechanisms of Peritoneal Fibrosis: Focus on Immune Cells–Peritoneal Stroma Interactions. *Frontiers in Immunology*. 2021;12:1–17.
10. Voloshyn MA. Limfotsyt – faktor morfohenezu orhaniv. *Zbirnyk tez dopovidey naukovy-praktychnoyi konf. Morfolohichni doslidzhennya – vyklyky suchasnosti*; 2015 Kvit 23–24; Kyiv. Sumy: SumDU; 2015. s. 5–6. [in Ukrainian].
11. Soleimani A, Asgharzadeh F, Rahmani F, Avan A, Mehraban S, Fakhraei M, et al. Novel oral transforming growth factor-β signaling inhibitor potently inhibits postsurgical adhesion band formation. *J. Cell. Physiol*. 2020;235:1349–1357.
12. Paidarkina AP, Kushch OG. Peritoneal remodeling and changes in its lymphoid component in experimental modeling of adhesion disease in rats. *ScienceRise: Biological Science*. 2024;1(38):10–16. [in Ukrainian].
13. Kushch OG, Zlobina OV. Osoblyvosti budovy platsenty i limfoidnoyi tkanyny, asotsiyovanoi z platsentoy u II-u periodi khvoroby u shchuriv. *Sb. tezysov I mezhdunar. internet-konferentsiyi molodykh uchenykh i stud. Sovremennye dostyzenyya medytynskoy u farmatsevticheskoy nauky*; 2012 Zhovt 23–25; Zaporizhzhya. Zaporizhzhya: ZHMU; 2012. s. 15–16. [in Ukrainian].
14. Kushch OG, Voloshyn MA. The relationship between the morphofunctional state of the lymphoid tissue of the skin of a newborn and the placenta. *SMB*. 2009;3-2:92–95.
15. Thaler MD, Judith A, Rong HZ, Mariana MD, Gary RI, Matthew SY, et al. Expression of connective tissue growth factor in intra-abdominal adhesions. *Dis Colon Rectum*. 2002;45(11):1510–1519.

ОСОБЛИВОСТІ РОЗПОДІЛУ КОЛАГЕНОВИХ ВОЛОКОН I-ГО ТА III-ГО ТИПІВ В БРИЖІ КИШКІВНИКА ЩУРІВ ПІД ЧАС ФОРМУВАННЯ СПАЙКОВОГО ПРОЦЕСУ

Пайдаркіна А. П., Куц О. Г.

Резюме. Для розуміння процесу формування зв'язку між вродженим і адаптивним імунітетом у черевній порожнині важливо дослідити структуру та організацію тканинного бар'єру між кишечником і черевною порожниною як динамічної структури. На сьогоднішній недостатньо досліджений адгезійний комплекс брижі тонкої кишки, міжклітинні взаємодії, та саме лімфоцито-фіброblastний контакт, і синтез колагенових волокон у його складі при моделюванні спайкового процесу.

Метою дослідження було ідентифікувати колагенові волокна 1-го та 3-го типу в сполучній тканині брижі тонкої кишки та вивчити їх топографію і функціональну активність у нормі та при прогресуючому спайкоутворенні.

Об'єкт і методи дослідження: препарування, макроскопічний, мікроскопічний, гістологічний (виготовлення плівкових препаратів), імпрегнація сріблом за методикою Лейдлоу, комп'ютерна мікроденситометрія, математичний (морфометрична сітка – підраховувалася кількість імунокомпетентних клітин на стандартну площу 1000 мкм²), статистичний за Ст'юдентом.

Результати. На основі попередньо отриманих даних виявлено специфіку гістологічних змін серозної оболонки тонкої кишки щурів під час прогресуючого спайкового процесу. На 7-у добу моделювання спайкового процесу у щурів помітна тенденція до зростання інтенсивності процесу утворення колагену. У дослідних групах тварин протягом усіх періодів спостережень відмічалася поступове збільшення відносної площі колагено-

вих волокон I-го і III-го типів. На 7-у, 14-у та 21-у добу моделювання спайкового процесу у щурів спостерігали підвищення інтенсивності процесу утворення колагену в брижі тонкої кишки, що було пов'язано з вираженим збільшенням колагенових волокон I-го та III-го. В дослідній групі на 21-у добу показник відносної площі колагенових волокон III-го типу зріс до $41,074 \pm 0,07\%$ на умовну одиницю площі, а для колагену I-го типу – до $26,123 \pm 0,24\%$, порівняно з інтактною групою (колаген I-го типу – $1,086 \pm 0,03\%$, колаген III-го типу – $0,74 \pm 0,11\%$). На тлі збільшення кількості лімфоцитів на умовну одиницю ділянки тонкої кишки і при прогресуванні процесу спайкоутворення підвищується білково-синтетична функція фібробластів, яка обумовлює морфогенетичні функції лімфоцитів. Контакт з антигеном активує B_1 і B_2 субпопуляції лімфоцитів і синтезує слабкі специфічні імунoglobуліни М-класу, які не проникають через тканинні бар'єри. Підвищення функціональної активності фібробластів веде до активної експресії колагену та інших компонентів сполучнотканинного матриксу.

Ключові слова: очеревина, брижа, спайкова хвороба, гістологічні зміни, колагенові волокна, щури, лімфоцит, імунітет, морфологія.

FEATURES OF THE DISTRIBUTION OF COLLAGEN FIBERS OF THE I-TH AND III-TH TYPES IN THE MESENTERY OF RATS DURING THE FORMATION OF THE ADHESION PROCESS

Paidarkina A. P., Kushch O. G.

Abstract. To understand the process of formation of the connection between innate and adaptive immunity in the abdominal cavity, it is important to study the structure and organization of the tissue barrier between the intestine and the abdominal cavity as a dynamic structure. To date, the adhesion complex of the mesentery of the small intestine, intercellular interactions, namely the lymphocyte-fibroblast contact, and the synthesis of collagen fibers in its composition in modeling the adhesion process have not been sufficiently studied.

The aim of the study was to identify type 1 and type 3 collagen fibers in the connective tissue of the mesentery of the small intestine and to study their topography and functional activity in normal and progressive adhesion formation.

Object and research methods: preparation, macroscopic, microscopic, histological (production of film preparations), impregnation with silver according to the Laidlaw method, computer microdensitometry, mathematical (morphometric grid – the number of immunocompetent cells was calculated per standard area of $1000 \mu m^2$), statistical according to Student.

Results. Based on previously obtained data, the specificity of histological changes in the serous membrane of the small intestine of rats during the progressive adhesion process was revealed. On the 7th day of simulation of the adhesion process in rats, there is a noticeable tendency towards an increase in the intensity of the process of collagen formation. A gradual increase in the relative area of collagen fibers of types I and III was noted in the experimental groups of animals during all observation periods. On the 7th, 14th, and 21st days of modeling the adhesion process in rats, an increase in the intensity of the process of collagen formation in the mesentery of the small intestine was observed, which was associated with a pronounced increase in collagen fibers I and III. In the experimental group, on the 21st day, the index of the relative area of type III collagen fibers increased to $41.074 \pm 0.07\%$ per conventional unit of area, and for type I collagen – to $26.123 \pm 0.24\%$, compared to the intact group (type I collagen – $1.086 \pm 0.03\%$, type III collagen – $0.74 \pm 0.11\%$). Against the background of an increase in the number of lymphocytes per conventional unit of the area of the small intestine and with the progression of the process of adhesion formation, the protein synthetic function increases of fibroblasts, which determines the morphogenetic functions of lymphocytes. Contact with antigen activates B_1 and B_2 subpopulations of lymphocytes and synthesizes weak specific immunoglobulins of the M-class, which do not penetrate through tissue barriers. An increase in the functional activity of fibroblasts leads to the active expression of collagen and other components of the connective tissue matrix.

Key words: peritoneum, mesentery, adhesion disease, histological changes, collagen fibers, rats, lymphocyte, immunity, morphology.

ORCID and contributionship / ORCID кожного автора та їх внесок до статті:

Paidarkina A. P.: <https://orcid.org/0009-0001-4436-1532> ^{BCD}

Kush O. G.: <https://orcid.org/0000-0003-3827-3752> ^{ACEF}

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The authors of the article confirm that they have no conflict of interest. / Автори статті підтверджують відсутність конфлікту інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Paidarkina Anastasiia Petrivna / Пайдаркіна Анастасія Петрівна

Zaporizhzhya National University / Запорізький національний університет

Ukraine, 69095, Zaporizhzhya, 62 Gogol str. / Адреса: Україна, 69095, м. Запоріжжя, вул. Гоголя 62

Tel.: +380507249841 / Тел.: +380507249841

E-mail: nastasia.p.nikolskaya97@gmail.com

A – Work concept and design, **B** – Data collection and analysis, **C** – Responsibility for statistical analysis, **D** – Writing the article, **E** – Critical review, **F** – Final approval of the article / **A** – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статистичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

Received 20.01.2024 / Стаття надійшла 20.01.2024 року

Accepted 28.04.2024 / Стаття прийнята до друку 28.04.2024 року