

ТРАНССЕРОЗНАЯ МУЛЬТИМОДАЛЬНАЯ ОПТИЧЕСКАЯ КОГЕРЕНТНАЯ ТОМОГРАФИЯ В ВИЗУАЛИЗАЦИИ МИКРОСТРУКТУРЫ И КРОВООБРАЩЕНИЯ СТЕНКИ ТОНКОЙ КИШКИ

DOI: 10.17691/stm2020.12.2.07

УДК 616.341–073.756.8

Поступила 20.01.2020 г.



М.Г. Рябков, д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник Университетской клиники¹;

Е.Б. Киселева, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории оптической когерентной томографии НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹;

М.С. Балеев, к.м.н., врач-хирург²;

Е.Л. Бедерина, врач-патологоанатом, младший научный сотрудник Университетской клиники¹;

М.А. Сизов, врач-хирург²;

А.Н. Воробьев, врач-хирург²;

А.А. Моисеев, к.ф.-м.н., старший научный сотрудник лаборатории высокочувствительных оптических измерений³;

М.М. Карабут, к.б.н., научный сотрудник научной лаборатории геномики адаптивного противоопухолевого иммунитета¹;

М.А. Плеханова, студент¹;

Н.Д. Гладкова, д.м.н., профессор, зав. лабораторией оптической когерентной томографии НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹

¹Приволжский исследовательский медицинский университет, пл. Минина, 10/1, Н. Новгород, 603005;

²Городская клиническая больница №30, ул. Березовская, 85а, Н. Новгород, 605157;

³Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики РАН, ул. Ульянова, 46, Н. Новгород, 603950

Цель исследования — изучение эффективности транссерозной мультимодальной ОКТ (ММ ОКТ) в обнаружении *in vivo* изменений микроструктуры и кровообращения кишечной стенки при артериовенозной ишемии, развившейся в результате ущемления тонкой кишки.

Материалы и методы. В ходе эксперимента крысам линии Wistar (n=22) после лапаротомии трансабдоминально с помощью ММ ОКТ исследовали стенку тонкой кишки *in vivo* со стороны ее серозной оболочки. Оценивали состояние микроциркуляторного русла и микроструктуру стенки интактной кишки, а также их изменения в условиях острой артериовенозной ишемии, которую создавали ущемлением участка кишки. Полученные данные сопоставляли с результатами гистологического и прижизненного микроскопического исследования.

Результаты. Транссерозная ММ ОКТ позволила визуализировать кишечную стенку на всю толщину, дифференцировать серозно-мышечный и слизисто-подслизистый слои, ворсинки, оценивать наличие функционирующих кровеносных сосудов. Структура слоев стенки кишки наиболее четко прослеживалась при введении в ее просвет жировой эмульсии. На ОКТ-изображениях тонкой кишки в режиме оптической когерентной ангиографии (ОКА) в норме визуализировались крупные парные сосуды (артерии и вены) и сеть микрососудов диаметром более 15 мкм. Основная масса кровеносных сосудов визуализировалась в диапазоне глубин 80–300 мкм от поверхности кишки. Капилляры диаметром 7–10 мкм не дифференцировались, но создавали на изображении общий яркий фон. Суммарная длина сосудистого русла на ОКА-изображениях, реконструированных с объема 2,4×2,4×1,8 мм, в норме составила 18,3 [16,6; 19,8] мм.

Ущемление петли кишки было ассоциировано с изменениями КП ОКТ-картины: в области ворсинок пропадал характерный вертикальный рисунок, исчезали тени от кровеносных сосудов, уменьшалась глубина визуализации ткани в кросс-канале. Оптические эквиваленты серозно-мышечного слоя сохранялись, через 180±12 мин ишемии их суммарная доля в общей толщине стенки кишки увеличивалась с 25 [18; 32] до 42 [31; 55]% (p=0,031). ОКА-изображения ущемленной петли кишки в это время выглядели однотипно: однородный темный фон с единичными обрывочными крупными сосудами, отсутствием признаков кровотока в микрососудистой сети.

Заключение. Транссерозная ММ ОКТ позволяет *in vivo* визуализировать критически важные для хирургической гастроэнтерологии микроструктуры: слои стенки кишки, включая ворсинки слизистой оболочки, кровеносные сосуды слоев, включая слизистую

Для контактов: Киселева Елена Борисовна, e-mail: kiseleva84@gmail.com

оболочку, что подтверждено данными гистологического анализа. Процессы деструкции в стенке кишки, развивающиеся в результате ее ущемления, вызывают изменения оптических свойств ткани и могут быть диагностированы с помощью ММ ОКТ в режиме реального времени.

Ключевые слова: ишемия тонкой кишки; ущемление тонкой кишки; жизнеспособность тонкой кишки; кросс-поляризационная оптическая томография; КП ОКТ; оптическая когерентная ангиография; гистоморфометрия.

Как цитировать: Ryabkov M.G., Kiseleva E.B., Baleev M.S., Bederina E.L., Sizov M.A., Vorobyov A.N., Moiseev A.A., Karabut M.M., Plekhanova M.A., Gladkova N.D. Trans-serosal multimodal optical coherence tomography for visualization of microstructure and blood circulation of the small intestine wall. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2020; 12(2): 56–66, <https://doi.org/10.17691/stm2020.12.2.07>

English

Trans-Serosal Multimodal Optical Coherence Tomography for Visualization of Microstructure and Blood Circulation of the Small Intestine Wall

M.G. Ryabkov, MD, DSc, Associate Professor, Leading Researcher, University Clinic¹;
E.B. Kiseleva, PhD, Senior Researcher, Scientific Laboratory of Optical Coherence Tomography, Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹;
M.S. Baleev, MD, PhD, Surgeon²;
E.L. Bederina, Pathologist, Junior Researcher, University Clinic¹;
M.A. Sizov, Surgeon²;
A.N. Vorobyov, Surgeon²;
A.A. Moiseev, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Highly Sensitive Optical Measurements³;
M.M. Karabut, PhD, Researcher, Genomics Adaptive Antitumor Immunity Research Laboratory¹;
M.A. Plekhanova, Student¹;
N.D. Gladkova, MD, DSc, Professor, Head of the Scientific Laboratory of Optical Coherence Tomography, Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹

¹Privolzhsky Research Medical University, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia;

²City Clinical Hospital No.30, 85A Berezovskaya St., Nizhny Novgorod, 605157, Russia;

³Federal Research Center Institute of Applied Physics of the Russian Academy of Sciences, 46 Ul'yanova St., Nizhny Novgorod, 603950, Russia

The aim of the study was to evaluate the performance of trans-serosal multimodal OCT (MM OCT) in *in vivo* detecting of changes in microstructure and blood circulation of the small intestine wall caused by arteriovenous ischemia resulted from intestine strangulation.

Materials and Methods. In experiments on Wistar rats (n=22), we examined the small intestine wall *in vivo* using MM OCT; the access to the intestine was reached through laparotomy. The microvasculature and microstructure of the wall were studied before and after acute arteriovenous ischemia created by ligation of a small bowel segment. The results were then added with data obtained from histological and intravital microscopic examination.

Results. Trans-serous MM OCT allowed us to visualize the bowel wall to its entire thickness, distinguish between the serous-muscular and mucous-submucosal layers, and detect the villi and functioning blood vessels. The structures were best seen after a fat emulsion had been administered into the bowel lumen. In OCT images made in the optical coherent angiography (OCA) mode, large paired vessels (arteries and veins) and micro-vessels with a diameter of >15 μm could be seen. Most of the blood vessels were imaged in the depth range of 80–300 μm from the surface. Capillaries with a diameter of 7–10 μm were not seen, but they produced an overall bright background. In the OCA images reconstructed from a volume of 2.4×2.4×1.8 mm, the total length of the vascular bed before ischemia was 18.3 [16.6; 19.8] mm.

Strangulation of the intestinal loop was associated with changes in the CP OCT picture: the villi-associated vertical pattern and shadows of blood vessels disappeared and the depth of tissue visualization in the cross-channel decreased. The optical equivalents of the serous-muscular layer were preserved; after 180±12 min of ischemia, their proportion in the intestinal wall thickness increased from 25 [18; 32] to 42 [31; 55]% (p=0.031). At that time-point, OCA images of the strangulated bowel loop looked all similar: a uniform dark background with isolated fragmentary large vessels and no signs of blood flow in the microvascular network.

Conclusion. Trans-serous MM OCT provides for *in vivo* visualization of microstructures critical for surgical gastroenterology: the intestinal wall layers including villi and blood vessels of each layer, as confirmed by histological analysis. Destructive processes in the intestinal wall resulting from bowel ligation bring about optical changes, which can be detected using real-time MM OCT.

Key words: small bowel ischemia; small intestinal strangulation; viability of the small intestine; cross-polarization optical coherence tomography; CP OCT; optical coherence angiography; histomorphometry.

Введение

Решение наиболее сложных задач хирургической гастроэнтерологии невозможно без точной диагностики морфофункционального состояния всех сегментов желудочно-кишечного тракта [1]. Интенсивность международной исследовательской работы в этом направлении не оставляет сомнений в ее высокой актуальности [2–5]. Основной современной тенденцией является разработка прижизненных, минимально инвазивных label free методов диагностики в комплексе с алгоритмами обработки получаемой информации (в том числе изображений). Вместе с тем достижения в диагностике состояния отдельных сегментов желудочно-кишечного тракта неравнозначны, перед исследователями и клиницистами стоит еще множество нерешенных задач. Одна из причин сложившейся ситуации — объективные ограничения современных диагностических технологий. Так, флуоресцентная ангиография ограничена в эффективности, поскольку исключает возможность исследования глубоко расположенных сосудов [6]. Разрешающая способность МРТ и позитронно-эмиссионной томографии не позволяет визуализировать интрамуральные капилляры, обе технологии не отвечают требованиям портативности, не предполагают многократного повторения процедуры, что особенно важно в хирургической гастроэнтерологии [7]. Лазерная доплеровская флоуметрия не обеспечивает визуализации, представляя результаты исследования сосудов в виде цифровых данных, а самое главное — не дает представления о микроструктуре кишечной стенки [8]. Микроскопия, основанная на методе темного поля, ограничена глубиной визуализации до 1 мм, что недостаточно для изучения стенки тонкой кишки даже лабораторных животных [9, 10].

Есть основания предполагать, что эффективной альтернативой традиционным методам исследования стенки кишки может служить мультимодальная оптическая когерентная томография (ММ ОКТ). Известно, что этот метод позволяет получать изображения объектов микроструктуры ткани размером от 25 до единиц микрометров в режиме реального времени на глубину 1,5 мм, а также в режиме оптической когерентной ангиографии (ОКА) отображать интрамуральную сосудистую сеть и получать 2D- и 3D-изображения ткани [11]. В целом информация о структуре и кровообращении в ткани может быть получена с разрешением, приближающимся к эксцизионной биопсии, без необходимости забирать образцы ткани или применять дополнительные контрастные вещества [12].

До настоящего времени основным направлением развития ОКТ в гастроэнтерологии оставалась внутрипросветная эндоскопическая диагностика, которая позволила существенно продвинуться в исследовании пищевода, желудка, толстой кишки [13–16]. Поскольку возможности применения эндоскопиче-

ской внутрипросветной ОКТ дистальнее двенадцатиперстной кишки и проксимальнее толстой кишки резко ограничены, тонкая кишка до настоящего времени остается наименее изученным сегментом пищеварительного тракта [3]. Дефицит возможностей диагностики тонкой кишки наиболее ощутим в области экстренной хирургии желудочно-кишечного тракта, где быстрое получение объективной информации о структуре и кровообращении на конкретном участке органа служит важнейшим фактором выбора способа лечения.

Мы предположили, что ММ ОКТ, примененная в процессе трансабдоминального транссерозного исследования, позволит получить объективные данные о микроструктуре и кровообращении стенки тонкой кишки *in vivo* в норме и в условиях ее острой ишемии, что расширит диагностические возможности хирургической гастроэнтерологии.

Цель исследования — изучение эффективности транссерозной мультимодальной ОКТ в обнаружении *in vivo* изменений микроструктуры и кровообращения кишечной стенки при артериовенозной ишемии, развившейся в результате ущемления тонкой кишки.

Материалы и методы

Экспериментальное исследование проведено на крысах линии Wistar (самцах) массой от 210 до 377 г (n=22). При работе с животными руководствовались Приказом №199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» (Россия, 2016) и «Международными рекомендациями (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (CIOMS и ICLAS, 2012), при этом неукоснительно соблюдались этические принципы, установленные Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006). На проведение экспериментальных исследований на животных получено разрешение Этического комитета Приволжского исследовательского медицинского университета.

Все процедуры выполнялись под общим обезболиванием смесью растворов 3,5% Золетила и 2% ксилазина гидрохлорида, вводимых животным внутримышечно.

В ходе эксперимента с помощью ММ ОКТ, включающей возможность проведения ОКА и исследования поляризационных свойств ткани (кросс-рассеяние), в режиме реального времени оценивали состояние микроциркуляторного русла и микроструктуру стенки тонкой кишки крыс в норме и в состоянии острой артериовенозной ишемии, которую создавали путем ущемления петли. Технология ОКТ основана на регистрации обратнорассеянного низкоинтенсивного света ближнего инфракрасного диапазона. Использован спектральный мультимодальный оптический когерентный томограф, разработанный в Федеральном иссле-

довательском центре Институт прикладной физики РАН (Н. Новгород), с длиной волны зондирующего поляризованного излучения 1300 нм [17]. Продольное разрешение системы составляет 10 мкм, разрешение по глубине — 15 мкм, глубина сканирования в воздухе — до 2 мм. Скорость сканирования — 20 000 А-сканов в секунду. Размер получаемых в течение 26 с объемных изображений составляет 2,4×2,4×1,8 мм. Кросс-поляризационная ОКТ-модальность (КП ОКТ) позволяет строить два вида изображений: на одних отображается общая структура ткани (как в поперечном сечении, так и при виде сверху), на других сигнал появляется только от компонентов, изменивших поляризацию зондирующего излучения на ортогональную. Режим ОКА основан на анализе вариации спекловой картины ОКТ-сигнала и позволяет визуализировать кровеносные сосуды, включая капилляры, с функционирующим кровотоком [18].

После лапаротомии выводили фрагмент тощей кишки, локализованный на 20–25 см дистальнее дуоденоюнального перехода. Для минимизации влияния на ОКТ-картину перистальтических движений и колебаний кишки, обусловленных дыханием животного, исследуемую петлю укладывали на специальный столик, фиксированный рядом с лапаротомной раной. ММ ОКТ-исследование проводили контактно, со стороны серозной оболочки кишки, фиксируя торцевой зонд на ее боковой поверхности в области, равно удаленной от брыжеечного и противобрыжеечного краев.

Состояние микроструктуры и микроциркуляторного русла сегмента тощей кишки у всех 22 животных оценивали в трех ее зонах в норме (до любых воздействий) (рис. 1, а), затем у 2 животных — после введения в просвет кишки жировой эмульсии для контрастирования ворсинок слизистой оболочки, еще у 11 животных — после моделирования острой

артериовенозной ишемии (ущемления кишки) путем перевязки петли тощей кишки и участка ее брыжейки с сосудистым пучком (рис. 1, б). Зоной считали участок кишечной стенки длиной 1 см, расстояние между зонами равнялось 1,5–2,0 см. Длина перевязанного участка кишки составляла 6,4 [5,5; 6,9] см. В ущемленной петле ММ ОКТ-сканирование проводили сразу после перевязки участка кишки и через 180±12 мин, перед взятием образцов на гистологию. С каждой исследуемой зоны кишки в каждой временной точке записывали по 2–3 объемных ОКТ-изображения, всего получено 162 изображения. Для верификации данных ОКА эти изображения микроциркуляторного русла сравнивали с макрофотографиями того же участка кишечной стенки, полученными с помощью стереомикроскопа Axio Zoom.V16 (Carl Zeiss, Германия).

Все исследованные участки кишки проходили гистологическую верификацию: 33 образца взяты у 11 животных без моделирования острой ишемии, у 2 из них — после введения жировой эмульсии; еще 33 образца — у 11 животных из ущемленной петли (рис. 1, в). Используются два вида окрасок: гематоксилин и эозин и PAS-реакция для выявления нарушения целостности эпителия ворсинок слизистой оболочки кишки (специфично окрашиваются гликоген, нейтральные глико- и мукопротеины, сиаломукопротеины и гликолипиды).

На структурных КП ОКТ-изображениях в программе ImageJ измеряли общую толщину кишечной стенки, визуально описывали состояние ворсинок слизистой оболочки. При пересчете всех измеренных толщин средний показатель преломления ткани кишки считали равным 1,37 [19].

По ОКА-изображениям вычисляли общую длину функционирующих кровеносных сосудов стенки

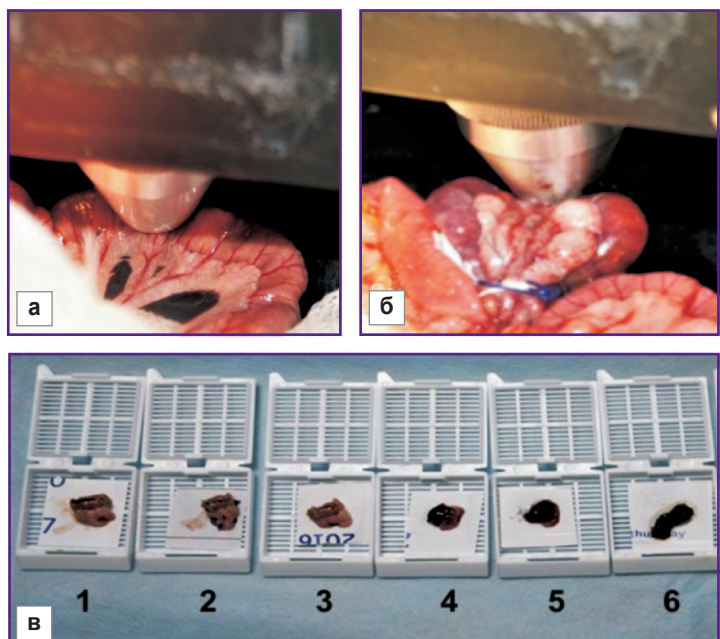


Рис. 1. Исследование стенки тонкой кишки крысы методом ММ ОКТ:

а — положение ММ ОКТ-зонда на здоровой тонкой кишке; б — положение ММ ОКТ-зонда после моделирования ущемления кишки; в — образцы тонкой кишки, исследованные методом ММ ОКТ, взятые для гистологического анализа: 1–3 — без моделирования острой артериовенозной ишемии; 4–6 — из ишемизированного участка спустя 180±12 мин от начала ущемления

кишки в норме (n=148) и при артериовенозной ишемии (n=140). Методика оценки длины функционирующих кровеносных сосудов подробно описана в работе [20].

Гистологическое исследование (морфометрию) проводили с помощью микроскопа Eclipse Ci (камера DS-Fi2; Nikon, Япония): по визуальным критериям определяли выраженность ишемических и воспалительных повреждений, наличие и обширность некроза отдельно для слизисто-подслизистого и серозно-мышечного слоев, измеряли общую толщину стенки кишки в норме и после ущемления.

Статистическую обработку данных выполняли с использованием пакета статистического анализа Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США) и программы Prism 6 (GraphPad Software, США). Проводили расчет медианных значений (Me) измеряемых величин и верхнего (Q1) и нижнего (Q3) квартилей. Достоверность различий между группами при сравнении количественных параметров микроструктуры и кровообращения стенки кишки определяли с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Во всех случаях статистически значимыми считали различия при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Микроструктура стенки тонкой кишки в норме по КП ОКТ-данным. Исследование стенки тонкой кишки экспериментальных животных в норме со стороны серозной оболочки продемонстрировало следу-

ющие особенности ее визуализации методом КП ОКТ (рис. 2).

1. Кишечная стенка визуализируется на всю толщину, от серозной оболочки до просвета (рис. 2, б). Введение воздуха, создающего резкую границу преломления света (рис. 2, в), а также введение в просвет кишки жировой эмульсии, обладающей более высокой рассеивающей способностью по сравнению с тканью кишечных ворсинок (рис. 2, г), помогло установить точную нижнюю (внутреннюю) границу кишечной стенки и убедиться, что затухание полезного ОКТ-сигнала до уровня шума происходит на глубине, превышающей толщину кишечной стенки. По КП ОКТ-данным толщина стенки тощей кишки крыс составляет 454 [363; 503] мкм, по гистологическим данным — 855 [790; 915] мкм. Разница в измеренных толщинах может быть связана, с одной стороны, с компрессией тканей в момент КП ОКТ-исследования, с другой — со сжатием резецированного фрагмента кишки по его длине и одновременным утолщением всех слоев кишечной стенки вследствие потери мышечного тонуса.

2. Отдельные слои (серозный, мышечный, подслизистый и слизистый) на КП ОКТ-изображениях в ко- и кросс-поляризациях не различимы. Это обусловлено рядом причин: в первую очередь малыми толщинами наружных слоев, их компрессией при контакте ОКТ-зонда с поверхностью кишки, а также близкими рассеивающими свойствами тканей. Однако наличие теней за кровеносными сосудами, расположенными в подслизистом слое, и характерная форма ворсинок

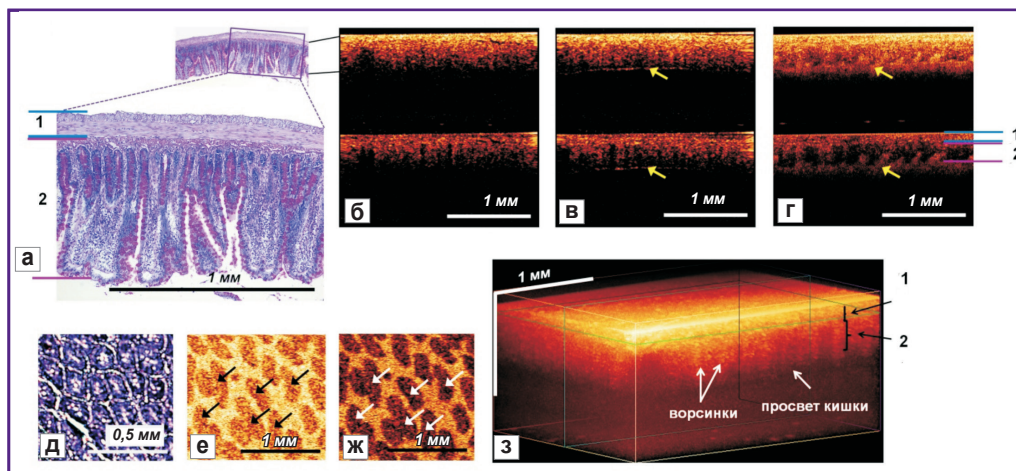


Рис. 2. Микроструктура стенки тонкой кишки крысы в норме:

а — гистологический препарат (PAS-реакция), соответствующий 2D кросс-секционным КП ОКТ-изображениям (б–г), полученным со стороны серозной оболочки: верхняя часть — изображение в ко-поляризации, нижняя часть — в кросс-поляризации. Желтые стрелки указывают на внутреннюю границу стенки кишки с пузырьком воздуха (в) и с жировой эмульсией (г). Цифрой 1 обозначены серозный и мышечный слои, цифрой 2 — подслизистый и слизистый слои; д — гистологический препарат поперечного среза (*en face*) ворсинок слизистой оболочки и соответствующие 2D ОКТ-изображения в ко- (е) и кросс- (ж) поляризациях, на которых ворсинки с более низким уровнем сигнала (обозначены стрелками) контрастированы высоко рассеивающей средой, заполнившей пространства между ворсинками; з — 3D ОКТ-изображение

позволяют визуально разделять серозно-мышечный (рис. 2, а, цифра 1, см. рис. 2, б, в) и слизисто-подслизистый слои (рис. 2, а, цифра 2, см. рис. 2, б, в), которые еще более четко прослеживаются при введении в просвет кишки контрастной жидкости, заполняющей пространства между ворсинками (см. рис. 2, в). На изображении в кросс-поляризации наличие коллагеновых волокон в подслизистом слое создает области с локальным высоким кросс-рассеянием, что также позволяет идентифицировать этот слой. Подслизистый слой и слизистая оболочка по КП ОКТ-данным суммарно составляют 75 [68; 82]% от общей толщины кишечной стенки, по гистологическим данным доля слизисто-подслизистого слоя составляет 86 [82; 88]%.

3. Качество визуализации ворсинок слизистой оболочки существенно различается в зависимости от условий ОКТ-сканирования и способа представления ОКТ-данных: на кросс-секционных 2D КП ОКТ-изображениях ворсинки ясно визуализируются только при введении в просвет кишки жировой эмульсии в качестве ОКТ-контрастного вещества (см. рис. 2, в); на 2D-изображении *en face* (рис. 2, е, ж) поперечный срез ворсинок полностью соответствует картине гистологического среза стенки кишки (рис. 2, д); на 3D ОКТ-изображении стенки кишки прослеживается вертикальная стратификация в области ворсинок, остальные слои не имеют четких границ (рис. 2, з).

Микроструктура стенки тонкой кишки при ее длительном ущемлении по КП ОКТ-данным. После ущемления петли кишки КП ОКТ-картина слоев ее стенки динамично менялась. В области ворсинок пропадал характерный вертикальный рисунок, что было вызвано как их прогрессирующим некрозом, так и исчезновением теней от кровеносных сосудов — это соответствовало уменьшению глубины визуализации ткани в кросс-канале (рис. 3, а, б, д); в просвете кишки визуализировались пузырьки газа (см. рис. 3, а, б), со временем начинала визуализироваться противоположная сторона кишечной стенки (см. рис. 3, б). Через 180 мин от начала ущемления оптические эквиваленты серозной оболочки и мышечного слоя сохранялись, причем их суммарная доля в общей толщине стенки кишки увеличивалась с 25 [18; 32] до 42 [31; 55]% ($p=0,031$), а доля подслизистой и слизистой оболочек, наоборот, сокращалась с 75 [68; 82] до 58 [45; 69]% ($p=0,028$). На 3D-изображении ущемленной кишки оптические эквиваленты отдельных ворсинок, в отличие от здоровой кишечной стенки, не визуализировались (рис. 3, в).

Так же, как на КП ОКТ-изображениях, общая толщина стенки кишки на гистологических препаратах ущемленной петли (601 [509; 786] мкм) была меньше, чем интактной кишки. При селективном анализе толщины слоев кишечной стенки ущемленной петли отмечено увеличение серозного и мышечного слоев, которые были толще этих же слоев в норме в абсолютном

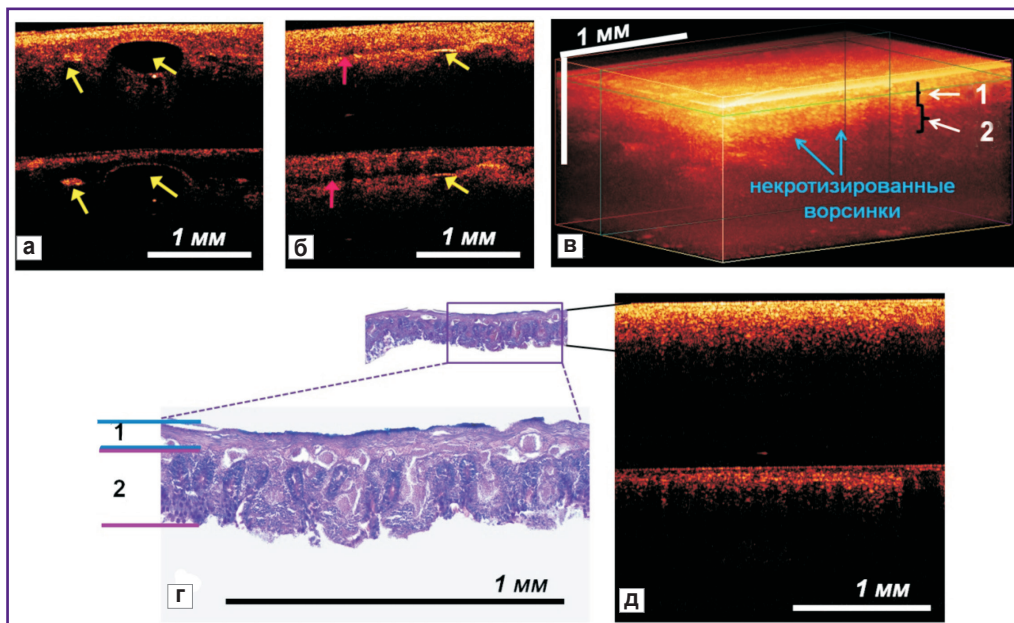


Рис. 3. Микроструктура стенки ущемленной тонкой кишки крысы:

а, б, д — 2D кросс-секционные КП ОКТ-изображения, полученные со стороны серозной оболочки ущемленной кишки: верхняя часть — изображение в ко-поляризации, нижняя часть — в кросс-поляризации. Желтые стрелки указывают на пузырьки газа в просвете кишки; розовые стрелки — на суженный просвет кишки, ниже которого визуализируется противоположная стенка органа; в — 3D ОКТ-изображение; г — гистологический препарат (PAS-реакция), соответствующий изображению (д). Цифрой 1 обозначены серозный и мышечный слои, цифрой 2 — подслизистый и слизистый слои

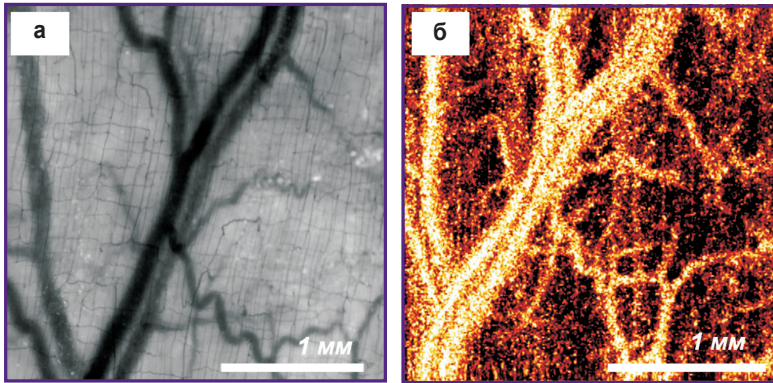


Рис. 4. Сравнительные изображения микроциркуляторного русла тонкой кишки крысы в норме, полученные методами световой микроскопии (а) и ОКА (б) со стороны серозной оболочки

Наблюдается совпадение (наличие и взаимное расположение) крупных и отходящих от них более мелких кровеносных сосудов

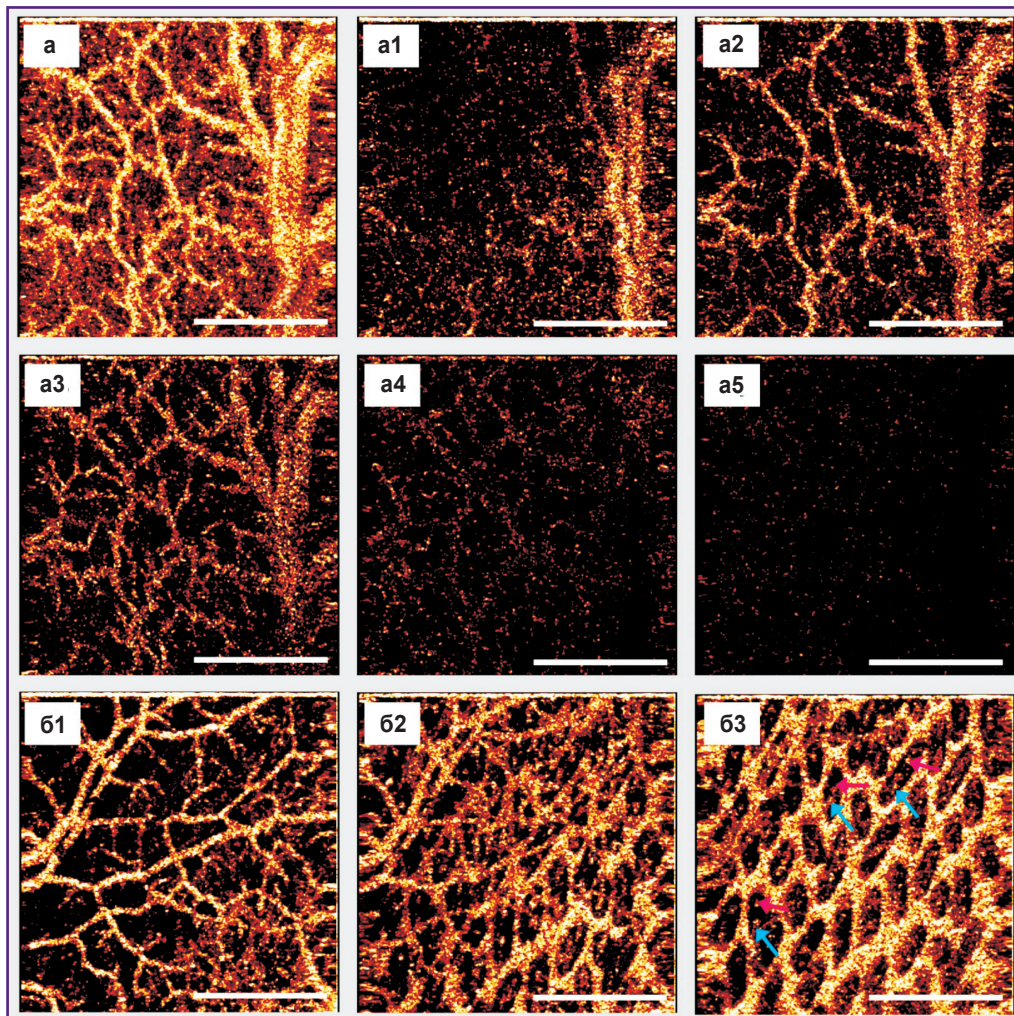


Рис. 5. Интрамуральная сосудистая сеть тонкой кишки крысы в норме, визуализированная методом ОКА:

а — сеть кровеносных сосудов, суммарно построенная по всему объему ОКТ-данных ($z=1800$ мкм), а1–а5 — последовательные ОКА-изображения, построенные по части ОКТ-объема ($z=150$ мкм), от субсерозного слоя к слизистой оболочке на глубине от поверхности кишки 10–160 мкм (а1), 80–230 мкм (а2), 150–300 мкм (а3), 220–370 мкм (а4), 290–440 мкм (а5). Основная масса кровеносных сосудов визуализируется в диапазоне глубин 80–300 мкм от поверхности ткани (изображения а2, а3), что соответствует нижней части мышечного слоя, подслизистому и слизистому слоям, включая основание ворсинок; б1–б3 — последовательные ОКА-изображения, построенные по части ОКТ-объема ($z=150$ мкм) в момент нахождения жировой эмульсии в просвете кишки: на уровне серозного, мышечного и части подслизистого слоев (б1); на уровне подслизистого и слизистого слоев (б2), где в правом нижнем углу на ярком фоне контрастируются основания ворсинок (их поперечный срез); на уровне ворсинок слизистой оболочки (б3), где на поперечном срезе ворсинок можно видеть расположенные в них артериолы и венулы (яркие точки для примера обозначены голубыми и розовыми стрелками). Бар — 1 мм

выражении в 2,4 раза ($p=0,001$) за счет отека и выраженной венозной гиперемии тканей. При этом в 1,6 раза увеличивалось в сравнении с нормальной кишкой отношение толщины серозно-мышечного и слизисто-подслизистого слоев, главным образом из-за сокращения толщины слизистой оболочки на фоне некроза и деструкции ворсинок (рис. 3, *з*).

Кровообращение стенки тонкой кишки в норме по данным ОКА. На ОКА-изображениях тонкой кишки в норме визуализировались многочисленные кровеносные сосуды разных диаметров, крупные парные сосуды (с большим диаметром — вена, с меньшим — артерия), сеть микрососудов равномерно распределялась по изображению (рис. 4, *б*, 5, *а*). Верификация кровеносных сосудов на таких изображениях проведена путем сопоставления с цифровыми фотографиями, полученными с того же участка кишечной стенки при исследовании под микроскопом. Наблюдается совпадение (наличие и взаимное расположение) крупных и отходящих от них более мелких кровеносных сосудов (рис. 4). Однако по сравнению с микроскопическими изображениями, четко отображающими капиллярную сеть, на ОКА-изображениях ввиду разрешающей способности прибора 15 мкм капилляры в истинном диаметре (7–10 мкм) не визуализируются, но видны как сосуды

диаметром 15–20 мкм, создавая общий яркий фон. Количественный анализ ОКА-изображений показал, что общая длина сосудистого русла, реконструированного с объема $2,4 \times 2,4 \times 1,8$ мм, в норме составляет 18,3 [16,6; 19,8] мм.

Изменяя объем ОКТ-данных по глубине (задавая разные значения z), с которого строится сеть кровеносных сосудов, можно визуализировать сосуды на разных глубинах от поверхности вглубь ткани (рис. 5, *а1–а5*; рис. 6). Анализируя ОКА-изображения *а1–а5* на рис. 5, можно отметить, что основная масса кровеносных сосудов визуализируется в диапазоне глубин 80–300 мкм от поверхности ткани (см. рис. 5, *а2, а3*), что соответствует нижней части мышечного слоя, подслизистому и слизистому слоям, включая основание ворсинок. Кроме того, контрастирование жировой эмульсией позволило визуализировать на ОКА-изображениях капилляры ворсинок слизистой оболочки на их поперечном срезе (*en face*) (рис. 5, *б1–б3*).

Микроциркуляция стенки тонкой кишки при ее длительном ущемлении по данным ОКА. Сразу после ущемления на ОКА-изображениях наблюдается заметное уменьшение числа визуализируемых кровеносных сосудов, фон изображения становится почти черным, что связано с остановкой движения крови по

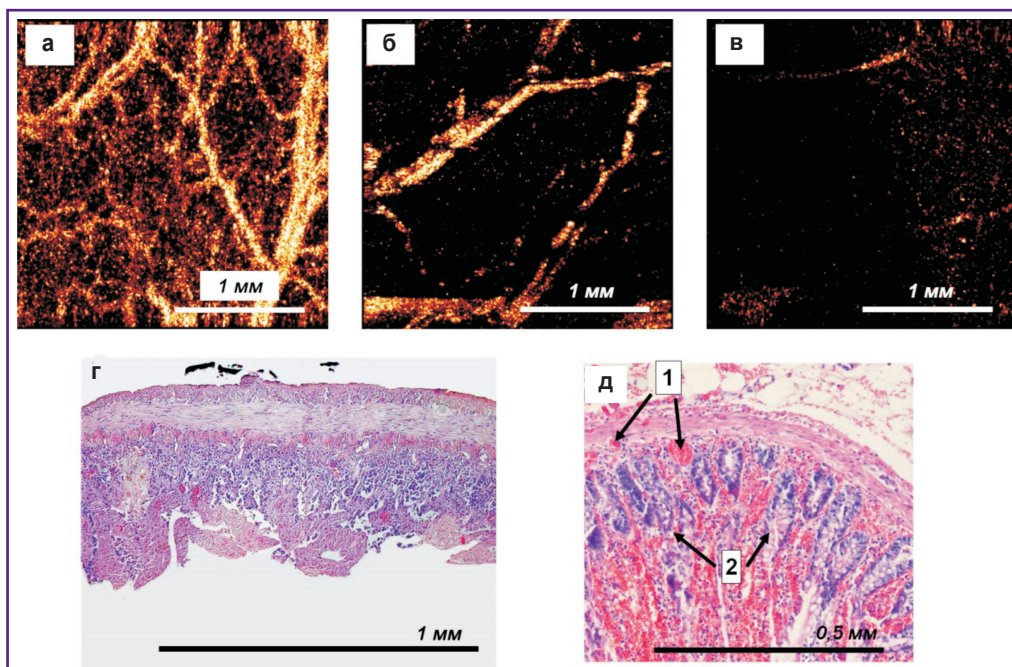


Рис. 6. Интрамуральная сосудистая сеть тонкой кишки крысы при ее длительном ущемлении:

а–в: ОКА-изображения до ущемления (*а*), сразу после ущемления (*б*) и через 180 мин артериовенозной ишемии (*в*); после ущемления кишечной стенки наблюдается заметное уменьшение числа визуализируемых кровеносных сосудов (*б*), со временем на ОКА-изображениях исчезают почти все кровеносные сосуды (*в*); *г, д:* соответствующие (*в*) гистологические препараты на малом (*г*) и большом (*д*) увеличениях, где наблюдается некроз большинства ворсинок слизистой оболочки (цифра 1) и части подслизистого слоя; стаз и тромбы (цифра 2) в кровеносных сосудах слизистой и подслизистой оболочек; окраска гематоксилином и эозином

большинству кровеносных сосудов (стаз эритроцитов, переходящий со временем в образование тромбов), а через 180 мин все ОКА-изображения ущемленной петли кишки выглядят однотипно: однородный темный фон с единичными обрывочными крупными артериями, отсутствием признаков кровотока в подавляющем объеме микрососудистой сети. В гистологических препаратах ущемленной кишки обнаружены признаки выраженного венозного полнокровия, которое проявляется наличием резко расширенных тромбированных вен в подслизистом и серозно-мышечном слоях кишечной стенки (рис. 6, а, д).

Общая длина функционирующих сосудов в стенке ущемленной кишки через 180 мин после ущемления была меньше исходной на $89,2 \pm 4,7\%$ ($p=0,001$) и составила $1,7 [0,8; 3,5]$ мм.

Таким образом, анализ сети кровеносных сосудов стенки тонкой кишки крыс методом ОКА в норме и при ее ущемлении подтвердил возможность диагностики состояния функционирующих артериальных и венозных сосудов с локализацией на различной глубине: от относительно крупных субсерозных сосудов до артериол и венул ворсинок слизистой оболочки.

Обсуждение

Поиск оптимального для хирургической гастроэнтерологии метода диагностики изменения структуры и функции стенки тонкой кишки при патологических процессах продолжается, и пока он далек от финала. Ни один из традиционных методов диагностики микроструктуры и кровообращения в стенке тонкой кишки не удовлетворяет полностью всем требованиям, предъявляемым к интраоперационной диагностике: неинвазивность; label free исследование; высокая разрешающая способность (на уровне клеток или групп клеток); возможность многократного повторения, сохранения и цифровой обработки полученных изображений [21]. Сложность задачи усугубляется и тем, что структура, функциональная активность сети кровообращения в слоях стенки тонкой кишки могут быстро изменяться с течением времени при острых заболеваниях и травмах кишечника [5, 10, 22]. Полученные нами с помощью метода КП ОКТ данные *in vivo* о характере повреждения сосудистой сети и структуры кишечной стенки при артериовенозной ишемии соответствуют опубликованным в работе [23] результатам исследования с использованием методов флуоресцентной микроскопии, лазерной доплеровской флуометрии и гистологического анализа, что подтверждает их достоверность.

Со времени первых публикаций об использовании ОКТ в начале 1990-х годов основной областью совершенствования метода была разработка эндоскопических приборов [24, 25]. В гастроэнтерологии разработаны множество эндоскопических инструментов ОКТ для исследования желудочно-кишечного трак-

та, прежде всего — для диагностики микроструктуры и кровообращения в стенке пищевода, желудка, желчевыводящих путей, некоторых сегментов кишечника [3, 15, 16]. Однако по сравнению с остальными частями желудочно-кишечного тракта тонкая кишка остается наиболее «проблемным» и наименее изученным пищеварительным органом. Проведенные ранее эндоскопические ОКТ-исследования позволили получить информацию о состоянии слоев кишечной стенки только в проксимальных и дистальных ее отделах — в двенадцатиперстной кишке и терминальном отделе подвздошной кишки [26–29]. Дальнейшие исследования методом внутрисветовой эндо-ОКТ в отношении тонкой кишки ограничены уровнем развития эндоскопической техники: для современных дуодено- и колоноскопов достижимы только начальный отдел тощей и терминальный отдел подвздошной кишки; баллонная энтероскопия не находит широкого применения в экстренной хирургии кишечника; капсульная интестиноскопия пока технически не совмещена с ОКТ.

Транссерозная ОКТ потенциально может обеспечить хирургов и исследователей данными о состоянии стенки кишки интраоперационно, на всем протяжении интересующего участка, без необходимости введения эндоскопа в просвет органа. Полученные в настоящей работе первые данные об исследовании тонкой кишки через наружную серозную оболочку нуждаются в систематизации и расширении, чтобы стать надежной основой для нового метода диагностики тонкой кишки.

Заключение

Транссерозная мультимодальная ОКТ позволяет *in vivo* визуализировать критически важные для принятия решения в хирургической гастроэнтерологии микроструктуры: слои стенки кишки, включая ворсинки слизистой оболочки, функционирующие кровеносные сосуды всех слоев кишки, включая слизистую оболочку, что подтверждается данными гистологического анализа.

Острые изменения в стенке кишки, развивающиеся в результате ее ущемления, вызывают в свою очередь изменения оптических свойств ткани и могут быть диагностированы с помощью мультимодальной ОКТ в режиме реального времени.

Финансирование исследования. Работа проведена при поддержке гранта Российского научного фонда №19-75-10096.

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература/References

1. Urbanavičius L., Pattyn P., de Putte D.V., Venskutonis D. How to assess intestinal viability during

- surgery. *World J Gastrointest Surg* 2011; 3(5): 59–69, <https://doi.org/10.4240/wjgs.v3.i5.59>.
2. Bryski M.G., Frenzel Sulyok L.G., Kaplan L., Singhal S., Keating J.J. Techniques for intraoperative evaluation of bowel viability in mesenteric ischemia: a review. *Am J Surg* 2020; in press, <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2020.01.042>.
 3. Tsai T.H., Leggett C.L., Trindade A.J., Sethi A., Swager A.F., Joshi V., Bergman J.J., Mashimo H., Nishioka N.S., Namati E. Optical coherence tomography in gastroenterology: a review and future outlook. *J Biomed Opt* 2017; 22(12): 1–17, <https://doi.org/10.1117/1.JBO.22.12.121716>.
 4. Liot E., Assalino M., Buchs N.C., Schiltz B., Douissard J., Morel P., Ris F. Does near-infrared (NIR) fluorescence angiography modify operative strategy during emergency procedures? *Surg Endosc* 2018; 32(10): 4351–4356, <https://doi.org/10.1007/s00464-018-6226-9>.
 5. Lim C., Malek A., Martins R., Pettillon S., Boulate G., Hentati H., De'Angelis N., Brunetti F., Salloom C., Laurent A., Compagnon P., Azoulay D. Real-time assessment of intestinal viability using indocyanine green fluorescent imaging (with video). *J Visc Surg* 2015; 152(1): 71–72, <https://doi.org/10.1016/j.jvisurg.2014.09.008>.
 6. Alander J.T., Kaartinen I., Laakso A., Pätilä T., Spillmann T., Tuchin V.V., Venermo M., Välisuo P. A review of indocyanine green fluorescent imaging in surgery. *Int J Biomed Imag* 2012; 2012(7): 1–26, <https://doi.org/10.1155/2012/940585>.
 7. Reginelli A., Iacobellis F., Berritto D., Gagliardi G., Di Grezia G., Rossi M., Fonio P., Grassi R. Mesenteric ischemia: the importance of differential diagnosis for the surgeon. *BMC Surg* 2013; 13(Suppl 2): S51, <https://doi.org/10.1186/1471-2482-13-S2-S51>.
 8. Tateishi S., Arima S., Futami K. Assessment of blood flow in the small intestine by laser Doppler flowmetry: comparison of healthy small intestine and small intestine in Crohn's disease. *J Gastroenterol* 1997; 32(4): 457–463, <https://doi.org/10.1007/BF02934083>.
 9. Bajory Z., Szabó A., Deák G., Varga R., Pajor L. Orthogonal polarization spectral imaging: a novel tool for examination of microcirculatory changes in the testis. *J Androl* 2012; 33(3): 499–504, <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.013599>.
 10. de Bruin A.F., Kommann V.N., van der Sloot K., van Vugt J.L., Gosselink M.P., Smits A., Van Ramshorst B., Boerma E.C., Noordzij P.G., Boerma D., van Iterson M. Sidestream dark field imaging of the serosal microcirculation during gastrointestinal surgery. *Colorectal Dis* 2016; 18(3): O103–O110, <https://doi.org/10.1111/codi.13250>.
 11. Drexler W., Liu M., Kumar A., Kamali T., Unterhuber A., Leitgeb R.A. Optical coherence tomography today: speed, contrast, and multimodality. *J Biomed Opt* 2014; 19(7): 071412, <https://doi.org/10.1117/1.JBO.19.7.071412>.
 12. Leitgeb R.A., Baumann B. Multimodal optical medical imaging concepts based on optical coherence tomography. *Front Phys* 2018; 6(114), <https://doi.org/10.3389/fphy.2018.00114>.
 13. Jäckle S., Gladkova N., Feldchtein F., Terentjeva A., Brand B., Gelikonov G., Gelikonov V., Sergeev A., Fritscher-Ravens A., Freund J., Seitz U., Schröder S., Soehendra N. In vivo endoscopic optical coherence tomography of esophagitis, Barrett's esophagus, and adenocarcinoma of the esophagus. *Endoscopy* 2000; 32(10): 750–755, <https://doi.org/10.1055/s-2000-7711>.
 14. Zuccaro G., Gladkova N., Vargo J., Feldchtein F., Zagaynova E., Conwell D., Falk G.W., Goldblum J., Dumot J., Ponsky J., Gelikonov G., Davros B., Donchenko E., Richter J. Optical coherence tomography of the esophagus and proximal stomach in health and disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(9): 2633–2639, <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2001.04119.x>.
 15. Tsai T.H., Lee H.C., Ahsen O.O., Liang K., Giacomelli M.G., Potsaid B.M., Tao Y.K., Jayaraman V., Figueiredo M., Huang Q., Cable A.E., Fujimoto J., Mashimo H. Ultrahigh speed endoscopic optical coherence tomography for gastroenterology. *Biomed Opt Express* 2014; 5(12): 4387–4404, <https://doi.org/10.1364/BOE.5.004387>.
 16. Samel N.S., Mashimo H. Application of OCT in the gastrointestinal tract. *Appl Sci* 2019; 9(15): 2991, <https://doi.org/10.3390/app9152991>.
 17. Gelikonov V.M., Romashov V.N., Shabanov D.V., Ksenofontov S.Yu., Terpelov D.A., Shilyagin P.A., Gelikonov G.V., Vitkin I.A. Cross-polarization optical coherence tomography with active maintenance of the circular polarization of a sounding wave in a common path system. *Radiophys Quant El* 2018; 60(11): 897–911, <https://doi.org/10.1007/s11141-018-9856-9>.
 18. Moiseev A., Ksenofontov S., Gorozhantseva M., Shakhova N., Sirotkina M., Kiseleva E., Matveev L., Zaytsev V., Zagaynova E., Gelikonov V., Gladkova N., Vitkin A., Gelikonov G. Real time OCT-based angiography device with hand-held probe for everyday clinical use. *J Biophotonics* 2018; 11: e201700292, <https://doi.org/10.1002/jbio.201700292>.
 19. Roggan A., Doerschel K., Minet O., Wolff D., Müller G. The optical properties of biological tissue in the near infrared wavelength range: review and measurements. In: *Laser-induced interstitial thermotherapy*. Bellingham: SPIE Press; 1995; p. 10–44.
 20. Maslennikova A.V., Sirotkina M.A., Moiseev A.A., Finagina E.S., Ksenofontov S.Y., Gelikonov G.V., Matveev L.A., Kiseleva E.B., Zaitsev V.Y., Zagaynova E.V., Feldchtein F.I., Gladkova N.D., Vitkin A. In-vivo longitudinal imaging of microvascular changes in irradiated oral mucosa of radiotherapy cancer patients using optical coherence tomography. *Sci Rep* 2017; 7(1): 16505, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16823-2>.
 21. Kawada K., Hasegawa S., Wada T., Takahashi R., Hisamori S., Hida K., Sakai Y. Evaluation of intestinal perfusion by ICG fluorescence imaging in laparoscopic colorectal surgery with DST anastomosis. *Surg Endosc* 2017; 31(3): 1061–1069, <https://doi.org/10.1007/s00464-016-5064-x>.
 22. Stacey R., Green J.T. Radiation-induced small bowel disease: latest developments and clinical guidance. *Ther Adv Chronic Dis* 2014; 5(1): 15–29, <https://doi.org/10.1177/2040622313510730>.
 23. Gordeeva A.E., Sharapov M.G., Tikhonova I.V., Chemeris N.K., Fesenko E.E., Novoselov V.I., Temnov A.A. Vascular pathology of ischemia/reperfusion injury of rat small intestine. *Cells Tissues Organs* 2017; 203(6): 353–364, <https://doi.org/10.1159/000455830>.
 24. Sergeev A.M., Gelikonov V.M., Gelikonov G.V., Feldchtein F.I., Kuranov R.V., Gladkova N.D., Shakhova N.M., Snopova L.B., Shakhov A.V., Kuznetsova I.A., Denisenko A., Pochinko V.V., Chumakov Yu.P., Streltsova O.S. In vivo endoscopic OCT imaging of precancer and cancer states of human mucosa. *Opt Express* 1997; 1(13): 432–440, <https://doi.org/10.1364/oe.1.000432>.
 25. Pfau P.R., Sivak M.V. Jr., Chak A., Kinnard M.,

Wong R.C., Isenberg G.A., Izatt J.A., Rollins A., Westphal V. Criteria for the diagnosis of dysplasia by endoscopic optical coherence tomography. *Gastrointest Endosc* 2003; 58(2): 196–202, <https://doi.org/10.1067/mge.2003.344>.

26. Gora M.J., Suter M.J., Tearney G.J., Li X. Endoscopic optical coherence tomography: technologies and clinical applications [Invited]. *Biomed Opt Express* 2017; 8(5): 2405–2444, <https://doi.org/10.1364/BOE.8.002405>.

27. Masci E., Mangiavillano B., Albarello L., Mariani A., Doglioni C., Testoni P.A. Pilot study on the correlation of optical coherence tomography with histology in celiac disease and normal subjects. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22(12): 2256–2260, <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04725.x>.

28. Masci E., Mangiavillano B., Barera G., Parma B., Albarello L., Mariani A., Doglioni C., Testoni P.A. Optical coherence tomography in pediatric patients: a feasible technique for diagnosing celiac disease in children with villous atrophy. *Digest Liver Dis* 2009; 41(9): 639–643, <https://doi.org/10.1016/j.dld.2009.02.002>.

29. Lee H.-C., Fass O., Ahsen O.O., Liang K., Wang Z., Figueiredo M., Potsaid B., Jayaraman V., Huang Q., Fujimoto J.G., Mashimo H. Endoscopic optical coherence tomography microangiography identifies the altered microvasculature of the terminal ileum in Crohn's disease. *Gastrointest Endosc* 2017; 85(5): AB511–AB512, <https://doi.org/10.1016/j.gie.2017.03.1180>.