

بررسی اثر مایع آمنیوتیک رقیق شده بر تغییرات هیستولوژیک روده جنین خرگوش مبتلا به گاستروشنزی

دکتر محمود اشرفی*، دکتر مهرداد حسین پور**، دکتر مهدی فرید***، دکتر محمدحسین صانعی****،
دکتر سارنگ یونسی****، دکتر مهرداد یادگاری*****، دکتر الیاس واحد*****

چکیده:

زمینه و هدف: تغییرات پاتولوژیک روده در بیماری گاستروشنزی ناشی از تماس جدار روده با مایع آمنیوتیک است در مطالعه حاضر تأثیر رقیق کردن این مایع بر تغییرات بافتی روده در جنین خرگوش مبتلا به گاستروشنزی بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها: در یک مطالعه تجربی بالینی ۱۰ جنین خرگوش به عنوان شاهد و ۷ جنین به عنوان کنترل و ۷ جنین به عنوان مورد بررسی شدند. با استفاده از جراحی جنین، شکم جنین باز و روده‌ها خارج می‌شدند و جنین در فرمالین قرار می‌گرفت. در گروه کنترل، با استفاده از جراحی جنین، گاستروشنزی ایجاد می‌شود و در گروه مورد، قبل از بستن زخم، کاتتر ورید مرکزی شماره ۱۴ در داخل رحم قرار می‌گرفت. از ۶ ساعت پس از عمل در گروه مورد با تزریق هر ۴ ساعت ۱-۲ سی سی مایع نرمال سالین گرم، مایع آمنیوتیک رقیق می‌شد. تغییرات بافت‌شناسی در سه گروه مقایسه شد.

یافته‌ها: در بررسی پاتولوژی روده‌ها مشخص گردید ضخامت مخاط، زیر مخاط و لایه عضلانی و سلول‌های گانگلیون در سه گروه تفاوت ندارد. ضخامت سرورز در گروه شاهد $4/5 \pm 3/6$ ، در گروه کنترل $64/2 \pm 28/7$ و در گروه مورد $6 \pm 4/1$ میکرومتر بود. در مقایسه با گروه شاهد ($P=0.001$) و مورد ($P=0.002$)، ضخامت لایه سرورز در گروه کنترل به طور معنی‌داری بیشتر بود. در بررسی هیستولوژیک در لایه سرورز، ارتشاح سلول‌های فیبروبلاست در جاتی از رسوب الیاف کلاژن و فیبرین وجود داشت.

نتیجه‌گیری: در صورت رقیق کردن مایع آمنیوتیک به طور متناوب می‌توان از اثرات سوء این مایع بر هیستولوژی روده جنین جلوگیری نمود.

واژه‌های کلیدی: گاستروشنزی، مایع آمنیوتیک، جنین، خرگوش، جراحی جنین

نویسنده پاسخگو: دکتر محمود اشرفی

تلفن: ۰۳۱۱-۶۲۵۵۵۵۵

Email: meh_hosseinpour@yahoo.com

* دانشیار گروه جراحی اطفال، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، بیمارستان الزهراء، بخش جراحی اطفال

** دستیار فوق تخصصی گروه جراحی اطفال، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، بیمارستان الزهراء، بخش جراحی اطفال

*** استادیار و متخصص جراحی دام کوچک، دانشگاه علوم پزشکی آزاد شهر کرد

**** استادیار و متخصص پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

***** استادیار و متخصص رادیولوژی، دامپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد شهر کرد

***** دامپزشک، دستیار تخصصی رادیولوژی، دام، دانشگاه علوم پزشکی آزاد شهر کرد

***** دامپزشک عمومی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد شهر کرد

تاریخ وصول: ۱۳۸۵/۰۴/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۵/۰۶/۲۸

زمینه و هدف

گاستروشنی یک آنومالی نسبتاً نادر مادرزادی بوده که در آن احشاء شکمی جنین از فضای شکم خارج شده و در تماس با مایع آمنیوتیک قرار می‌گیرند. در گاستروشنی روده بیرون زده کوتاه شده، ضخامت آن افزایش می‌یابد و توسط یک پوشش فیبروزه (Peel) احاطه می‌شود. این تغییرات باعث ایجاد مشکلات بالینی از جمله عدم توانایی در ترمیم جداره شکم، سوء جذب و کاهش حرکات روده‌ای برای مدت طولانی و آنتروکولیت نکروزان می‌شود.^{۱-۲}

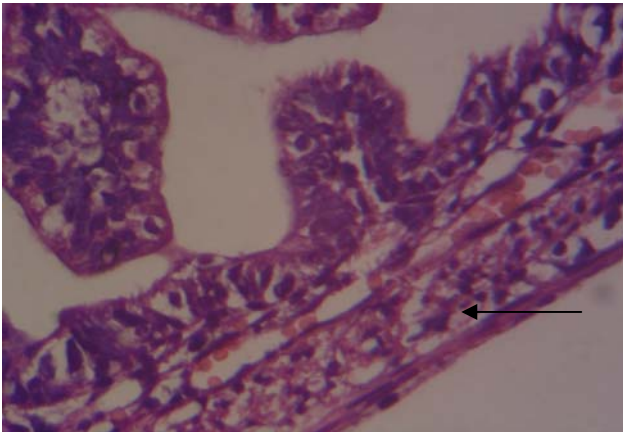
مطالعات بالینی و تجربی نشان داده‌اند که علت اصلی تغییرات روده ناشی از تماس روده‌ها با مایع آمنیوتیک می‌باشد.^{۴-۶} جهت جلوگیری از آسیب روده‌ای، مطالعات مختلفی در جهت مداخله بر روی جنین صورت گرفته است.^{۷-۹} استفاده از پوشش سیلاسیک و یا قرار دادن نیمه تحتانی جنین در فضای پربتونال مادر^{۱۰} در مطالعات تجربی بررسی شده است. در برخی مطالعات نیز نشان داده شده که تغییر ترکیب مایع آمنیوتیک در کاهش تغییرات روده‌ای مؤثر بوده است.^{۱۱-۱۵} در مطالعه حاضر، با توجه به تئوری تأثیر کمتر مایع آمنیوتیک رقیق شده بر روده، در یک مطالعه تجربی بر روی جنین خرگوش، اثر شستشوی متناوب سطح روده باریک جنین گاستروشنی شده با نرمال سالین گرم از طریق کاتتر ورید مرکزی (CVC) بر تغییرات روده باریک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

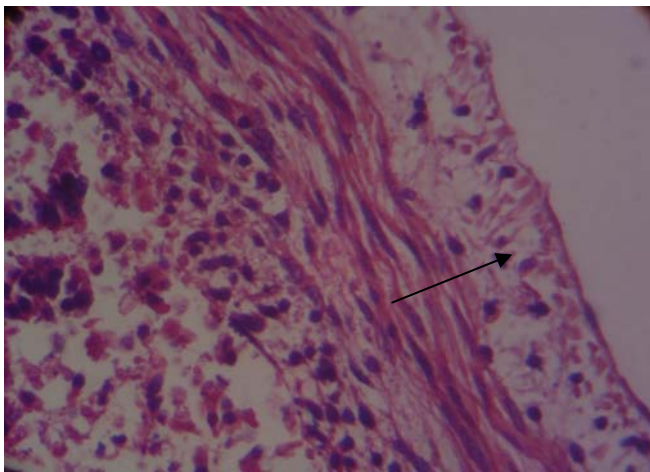
در یک مطالعه تجربی بالینی، ۱۵ خرگوش سفید (هر خرگوش دارای چند جنین است) ماده نیوزلندی با وزن ۲/۵ تا ۴ کیلوگرم انتخاب شده و با چند خرگوش نر جفت‌گیری گردیدند. محل انجام مطالعه بیمارستان دامپزشکی وابسته به دانشگاه آزاد شهرکرد بود. سپس خرگوش‌های ماده هر کدام در یک قفس با نور طبیعی قرار گرفتند و به طور سریال از آنها گرافی شکم (از روز ۱۸ لقاح) و سونوگرافی (از روز دوازدهم لقاح) به عمل می‌آمد. با توجه به طول دوره حاملگی خرگوش (۳۱ تا ۳۲ روز)، در روز ۲۳-۲۵ بارداری خرگوش ماده جهت انجام عمل آماده می‌گردید. قبل از عمل جراحی جهت آرام‌بخشی به خرگوش آمپول رامپون ۲٪ (Xylazine) به میزان ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تزریق می‌شد. محل تزریق داروهای بیهوشی در عضله ران خرگوش بود. آمپول سفازولین سدیم (100 mg/kg) به همراه شیاف ایندومتاسین نیم ساعت قبل از

عمل تجویز می‌گردید. جهت انجام بیهوشی از کتامین ۱۰٪ (35 mg/kg) و آسه پرومازین (1.2 mg/kg) استفاده می‌شد. پس از بیهوش شدن خرگوش، حیوان در وضعیت طاق باز روی تخت عمل قرار گرفته و شکم آن تراشیده می‌شد. سپس در محل خط برش لیدوکائین ۲ درصد (1 cc/cm²) تزریق می‌گردید.

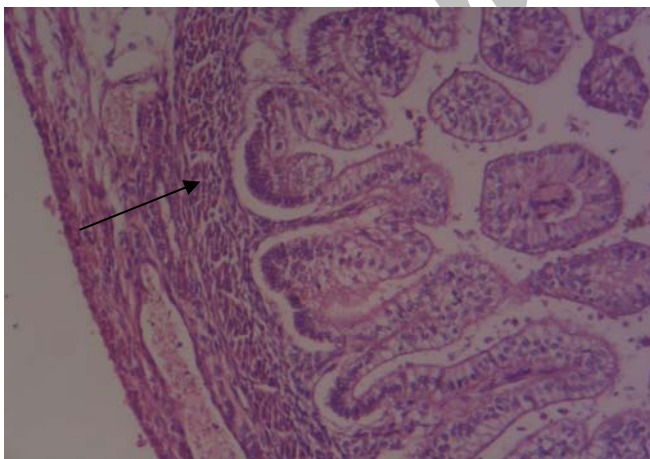
پس از تمیز کردن شکم با محلول بتادین، با روش طولی جداره شکم از بین غدد پستانی طرفی باز می‌شد تا احشاء شکمی و رحم مشخص شود. رحم خرگوش حامله به صورت دو شاخه (Bicornuate) بوده و در هر شاخ چند جنین می‌توانند وجود داشته باشند. پس از قرار دادن رحم در فیلد عمل، جداره رحم با استفاده از کوتر نوک سوزنی با برش ۱-۲ سانتیمتری طولی بر روی میوتر، کوربون و آمیون داده می‌شد تا جنین مشخص شود. سپس به آرامی در داخل رحم، شکم جنین مشخص می‌گردید. مایع آمنیوتیک در صورت امکان با سرنگ استریل جمع‌آوری می‌گردید. در حین عمل رحم و جنین به طور مرتب با سرم سالین گرم، مرطوب نگه داشته می‌شد. جهت انجام مطالعه، جنین‌های خرگوش در ۳ گروه قرار داده شدند. در گروه شاهد، جنین خرگوش دستکاری نشده و بلافاصله پس از زایمان شکم جنین باز، روده‌ها اکسپوز و در فرمالین فیکس می‌شد. در گروه کنترل، با استفاده از کوتر، یک نقص جداری در ناحیه پایین و راست شکم جنین ایجاد شده و با فشار روی مهره‌های جنین، روده‌ها از شکم خارج می‌شدند و سپس با ویکریل ۴ صفر جدار رحم به صورت Running ترمیم می‌شد. در گروه مورد پس از ایجاد گاستروشنی در جنین، یک کاتتر ورید مرکزی شماره ۱۴ (ساخت کارخانه Arrow، آلمان) از پوست عبور داده شد و انتهای آن داخل رحم گذاشته می‌شد و سپس رحم ترمیم می‌گردید. کاتتر در زیر شکم خرگوش در ناحیه پوست با سیلک ۲ صفر فیکس می‌شد. سپس جدار شکم خرگوش ترمیم و خرگوش در یک محیط گرم قرار گرفته تا به هوش آمده و سپس به قفس خود منتقل می‌شد. پس از عمل، آنتی‌بیوتیک‌ها و شیاف ایندومتاسین در فواصل ۶ ساعته مصرف می‌شدند. پس از گذشت ۶ ساعت از عمل در گروه مورد، در فواصل ۴ ساعته، ۱-۲ سی‌سی مایع نرمال سالین گرم از طریق کاتتر تجویز می‌گردید. در صورت بروز علائم زایمان خرگوش سریعاً آماده سزارین و جنین‌ها خارج می‌شدند. ۴۸ ساعت پس از عمل اول، مجدداً خرگوش‌ها به روش قبل بیهوش شده و جنین‌ها از طریق سزارین خارج و در محلول



تصویر ۱-الف



تصویر ۱-ب



تصویر ۱-ج

تصویر ۱- مقایسه تغییرات بافتی و ضخامت لایه، سروز (پیکان) در گروه‌های مورد مطالعه، گروه شاهد (الف)، گروه مورد (ب)، گروه کنترل (ج)

فرمالین قرار می‌گرفتند. سپس نمونه‌های به دست آمده به آزمایشگاه پاتولوژی بیمارستان الزهراء اصفهان منتقل گردیده و لام‌های متعددی از بافت روده با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزیون تهیه گردید. جهت بررسی مقایسه بافت‌شناسی روده‌ها از ضخامت کلی، ضخامت موکوزا و ساب موکوزا، ضخامت سروزال، میزان بافت کلاژن موجود در سروز، ضخامت عضله، وجود فیبرین در سروز و وجود سلول‌های گانگلیونی استفاده گردید. امکان اندازه‌گیری طول روده و ضخامت مزانتر جهت مقایسه فراهم نشد. در این مطالعه متغیرهای کمی به صورت میانگین به همراه انحراف معیار گزارش گردیده و جهت بررسی آماری از آزمون t استفاده شد. مقادیر P کمتر از 0.05 معنی‌دار تلقی شد.

یافته‌ها

در این مطالعه ۱۰ جنین خرگوش به عنوان شاهد، ۷ جنین خرگوش به عنوان کنترل و ۷ جنین خرگوش به عنوان مورد بررسی گردیدند. در تمام جنین‌های مورد مطالعه ارگان بیرون زده شامل روده باریک بود. میانگین ضخامت کلی جدار روده در گروه شاهد $285 \pm 49/6$ میکرومتر در گروه کنترل $289 \pm 39/6$ میکرومتر بود. ضخامت موکوزا و ساب موکوزا در گروه شاهد 52 ± 210 ، در گروه کنترل $85/4 \pm 184/2$ و در گروه مورد $38/6 \pm 177$ میکرومتر بود که در بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری نداشت. ضخامت عضله در گروه شاهد $22/8 \pm 68$ ، در گروه کنترل $13/2 \pm 55$ و در گروه مورد $16/43 \pm 58$ بود که تفاوت معنی‌داری نداشت. ضخامت سروز در گروه شاهد $3/6 \pm 0.5$ ، در گروه کنترل $28/7 \pm 64/2$ و در گروه مورد $4/1 \pm 6$ میکرومتر بود. در مقایسه با گروه شاهد ($P=0.001$) و مورد ($P=0.002$)، ضخامت لایه سروز در گروه کنترل به طور معنی‌داری بیشتر بود.

از نظر سلول‌های گانگلیون در سه گروه تفاوت خاصی مشاهده نشد. در بررسی هیستولوژیک جداره روده (تصویر ۱)، مشخص گردید که در گروه کنترل، سلول‌های دوکی شکل فیبروبلاست در لایه سروزال ارتشاح پیدا کرده و به درجاتی رسوب فیبرین نیز رسوب کرده است ولی در گروه مورد که جداره روده شسته شده بوده ارتشاح سلول‌های التهابی به همراه کمی ادم ایجاد شده بود ولی فیبروبلاست وجود نداشت. علاوه بر این در تمام جنین‌های گروه کنترل رسوب الیاف کلاژن نیز وجود داشت.

بحث و نتیجه‌گیری

تماس روده‌ها با مایع آمنیوتیک در بیماری گاستروشنزی می‌تواند باعث آسیب روده‌ای شود^{۴-۶} و همچنین در مطالعات متعددی نشان داده شده که با استفاده از آمنیوفیوژن (Amnionfusion) و تغییر ترکیب مایع آمنیوتیک می‌توان از بروز این آسیب جلوگیری کرد.^{۱۱-۱۵} در مطالعه حاضر به عنوان اولین مطالعه تجربی بالینی در این زمینه بر روی جنین در کشور ایران نیز هدف اصلی بررسی تأثیر آمنیوفیوژن در تغییرات بافت‌شناسی روده در جنین خرگوش مبتلا به گاستروشنزی بود. مهمترین یافته این تحقیق نشان می‌دهد که رقیق کردن مایع آمنیوتیک حتی در یک زمان کوتاه حداکثر ۴۸ ساعت می‌تواند از بروز تغییرات بافت‌شناسی منجر به آسیب روده جلوگیری کند.

دومین یافته این تحقیق نشان می‌دهد که مهمترین محل آسیب در گاستروشنزی، لایه سروزال می‌باشد. هر چند در مطالعه Haller و همکاران^۱ مشخص شده که شبکه میانتریکی روده در اثر تماس با مایع آمنیوتیک دچار اختلال می‌شود لیکن در مطالعه حاضر و سایر مطالعات^۹ مشخص می‌شود که مورفولوژی سلول گانگلیونی در گاستروشنزی دچار تغییر نمی‌شود.

در رابطه با ضخامت مخاط، هر چند در برخی مطالعات انسانی گزارش شده که ممکن است مخاط در گاستروشنزی نازک شود ولی در مطالعه حاضر و در سایر مطالعات ضخامت مخاط در گاستروشنزی تغییر نمی‌کند.

جهت توجیه ضخیم شدن لایه سروز در روده جنین مبتلا به گاستروشنزی چند عامل مطرح شده است:

۱- رسوب بافت گرانولاسیون روی سروز

۲- واکنش التهابی شدید که منجر به ضخیم شدن سروز

می‌شود

۳- التهاب مزمن و ایجاد سیکاتریکس

۴- ایجاد پوشش فیبرینی بر روی سطح پریتون

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که در جنین خرگوش، علت اصلی ضخیم شدن لایه سروزال، افزایش تعداد سلول‌های فیبروبلاست و الیاف کلاژن می‌باشد. در بررسی موارد بافت‌شناسی گاستروشنزی روده انسان نیز این موضوع مصداق داشته است. یکی از یافته‌های مهم این تحقیق نشان می‌دهد که تأثیر مایع آمنیوتیک بر جدار روده بسیار سریع و در طی ۱-۲ روز شروع می‌شود و بدین ترتیب در صورت اقدام به مداخله و جراحی جنین جهت جلوگیری از تشکیل Peel این اقدام باید در مراحل اولیه بارداری و با شروع دفع مایع آمنیوتیک از جنین باشد.

مایع آمنیوتیک موجود رحم، از ترکیبات ادرار و مدفوع جنین تشکیل می‌شود و در مطالعه Olguner^۲ نشان داده شده که اثر این دو با یکدیگر بیشتر از اثر هر یک به تنهایی می‌باشد.

محدودیت اصلی در مطالعه حاضر، عدم امکان پیش‌بینی یا مونتورینگ انقباضات رحمی در خرگوش مادر بوده که باعث شد در دو مورد به علت دردهای زایمان و پارگی رحم، جنین و خرگوش مادر فوت نمایند که در اتوپسی پارگی رحم مشخص شد و جنین‌ها از مطالعه نهایی خارج شدند. لیکن با توجه به امکانات موجود در جهت مونتورینگ انقباضات رحمی در انسان، به نظر نمی‌رسد که این مسئله در مطالعات انسانی خدشه‌ای وارد کند.

در مجموع مطالعه حاضر نشان می‌دهد که با استفاده از کارگذاری کاتتر CVC در رحم مادر و شستشوی مرتب رحم، می‌توان با رقیق کردن مایع آمنیوتیک از اثرات سوء این مایع به روی جداره روده جلوگیری نمود.

تشکر و قدردانی

از زحمات جناب آقای محمد لک دانشجوی رشته دامپزشکی که در انجام این طرح ما را یاری فرمودند، تشکر می‌نمائیم.

Abstract:

Evaluation of Effects of Diluted Amniotic Fluid on Histological Changes of Intestine of Rabbit Fetus with Gastroschisis

Ashrafi M. MD^{*}, Hosseinpour M. MD^{**}, Farid M. MD^{***}, Sanaee M.H. MD^{****},
Yonesi S. MD^{*****}, Yadegari M. MD^{*****}, Vahed E. MD^{*****}

Introduction & Objective: Intestinal damage in gastroschisis is due to contact of intestinal wall with amniotic fluid. In this study effects of fluid dilution on histological changes of intestine in rabbit fetus were evaluated.

Materials & Methods: In an experimental clinical trial, 10 rabbit fetuses as shams 7 an fetuses as controls and 7 fetuses as cases were studied. In shams, after delivery abdomen of fetus was opened and fetus was placed in formalin. In controls, with fetal surgery, we produce gastroschisis. In cases, before closure of hystrotomy, a 14 central vein catheter was placed in uterus and 6 hours later, amniotic fluid was diluted by injection of 1-2 cc of warm normal saline every four hours. Forty - eight hours later, fetuses were delivered by Cesarean section and analyzed histologically.

Results: There were no differences between, mucosa, submucosa, muscularis thickness and ganglion cell in groups. Serosal thickness was $4.5 \pm 3.6 \mu\text{m}$ in shams $64.2 \pm 28.7 \mu\text{m}$ in controls and $6 \pm 4.1 \mu\text{m}$ in cases group.

In control group, serosal thickness was higher than shams ($P=0.001$) and case group ($P=0.002$). In histological evaluation, fibroblast infiltration and collagen deposition with fibrin were seen in serosal layer.

Conclusions: With intermittently dilution of amniotic fluid, we can prevent the effects of this fluid on in fetal intestine histology.

Key Words: *Gastroschisis, Amniotic Fluid, Fetus, Rabbit*

* Associate Professor of Pediatric Surgery, Esfahan University of Medical Sciences and Health Services, Al-Zahra Hospital, Esfahan, Iran

** Resident of Pediatric Surgery, Esfahan University of Medical Sciences and Health Services, Al-Zahra Hospital, Esfahan, Iran

*** Assistant Professor of Veterinary Surgery, Shahrekord Azad University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

**** Assistant Professor of Pathology, Esfahan University of Medical Sciences and Health Services, Esfahan, Iran

***** Assistant Professor of Veterinary Radiology, Shahrekord Azad University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

***** Resident of Veterinary Radiology, Shahrekord Azad University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

***** General Veterinarian, Shahrekord Azad University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

References:

1. Amoury R, Beatty E, Wood WG, Holder T. Histology of the intestine in human gastroschisis. *J ped surg*. 1988, 23 (10): 950-59
2. Phillips JD, Kelly RE, Fon kalsrad EW. An improved model of experimental gastroschisis in fetal rabbits *J ped surg*. 1991, 26(7): 784- 787.
3. Langer J, Bramlett G. Effect of prokinetic agents on ileal contractility in a rabbit model of gastroschisis. *J ped surg* .1997, 32(4): 605-608.
4. Akgur F, Ozdemir T, olguner M, Aktyg T. An experimental study investigating the effects of intra peritoneal human neonatal urine and meconium on rat intestine. *Res Exp med*. 1998, 198: 207-213.
5. Sencan A, Gumustekin M, Gelal A. Effects of amino allantoic fluid exchange on bowel contractility in chick embryos with gastroschisis. *J ped surg*. 2002, 37 (11):1589-93.
6. Aktug T, Demir N, Akgur F. Pretreatment of gastroschisis with transabdominal amniotic fluid exchange. *Obstet gynecol*. 1998; 91(5): 821-823.
7. Spong C.Y, Ogundipe O.A, Ross MG. Prophylactic amnioinfusion for meconium - stained amniotic fluid. *Am J obstet gyncol*, 1994, 171(4): 931-935.
8. Sapin E, Mahieu D, Borg non J, Dourier S. Trans abdominal amnioinfusion to avoid fetal demise and intestinal damage in fetuses with gastroschisis and severe oligohydramnious. *J ped surg*, 2000, 35 (4): 598-600.
9. Minkes R. Abdominal wall defects. In: Oldham K, Colombani P Foglia R. Principles and practice of pediatric surgery. Philadelphia: lippincott WW. 2005 .PP: 1103-1119.
10. Aktug T, Erdag A, Akgur F. Amnio-allantoic fluid exchange for the prevention of intestinal damage in gastro schisis. *J ped surg* 1995, 30 (3): 384-387.
11. Owen J, Henson B. A prospective randomized study of saline solution amnioinfusion. *Am J obstet Gynecol*, 1990, 162(5): 1146-9.
12. Dommerguse M, Ansker Y, Aubry M. Serial trans abdominal amnioinfusion in the management of gastroschisis with severe oligo hydramnios. *J ped surg*, 1996, 31(9): 1297-1299.
13. Olguner M, Akgur FM. The effects of intra amniotic human neonatal urine and meconium on intestine of chick embryo with gastroschisis. *J ped surg* 2000, 35: 458-461.
14. Rinehart B, Terrine DA, Barrow H. Randomized trial of intermittent or continuous amnioinfusion for variable deceleration *Obstet Gynecol*, 2000, 69(4): 571-4.
15. Kluck P, under kamp T. The effect of fetal urine on the development of the bowel in gastroschisis. *J ped sugr*, 1983, 18(1)47-50.

Archive of SID