

УДК 611.018

ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НАДПОЧЕЧНИКА КРЫСЫ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ХИРУРГИЧЕСКИМ ЛАЗЕРОМ

Кемоклидзе К.Г., Тюмина Н.А.

ГБОУ ВПО «Ярославская государственная медицинская академия» Минздрава РФ»,
Ярославль, e-mail: k_g_k@mail.ru

Проведено гистологическое исследование надпочечника крысы непосредственно после воздействия хирургическим лазером с энергией 71,25 Дж (0 сутки) и спустя сутки после него (1 сутки). Выяснено, что в месте воздействия происходит испарение ткани надпочечника объёмом $0,27 \pm 0,08$ мм³ и образуется абляционная каверна. По мере удаления от неё возникают зона струпа (карбонизация и карамелизация), зона губчатого некроза (вапоризация) и зона внешне целых, но смертельно повреждённых клеток (тепловая фиксация, компактный некроз). Зона губчатого некроза состоит из двух слоёв, отличающихся по размерам вакуолей вапоризации и тинкториально. Глубина фототермического поражения достигает 1–2 мм. На 0 сутки отсутствует отчётливая граница между погибшими и выжившими клетками надпочечника и характерная для эндокриноцитов мозгового вещества хромаффинная реакция. В половине случаев к концу 1 суток отчётливая граница некроза проявляется, хромаффинная реакция восстанавливается, и как в толще, так и на периферии органа прибывают и активизируются клетки воспаления. В другой половине случаев клетки воспаления активны только на периферии органа и общая гистологическая картина сходна с таковой сразу после лазерного воздействия, что говорит о масштабном некрозе всего объёма органа и сохранении его в состоянии тепловой фиксации. Таким образом, применённая энергия лазерного воздействия вызывает выживание части паренхимы надпочечника или её полную гибель в соотношении 50/50, что говорит о том, что более высокая энергия вызовет гарантированную гибель паренхимы органа, а более низкая – выживание её значительной части. Показано, что клетки одной и той же популяции могут обладать неодинаковой фототермической устойчивостью. В то же время избирательного действия лазера на какую-либо разновидность клеток надпочечника не обнаружено.

Ключевые слова: надпочечник, воздействие лазера на ткань, устойчивость клеток к фототермическому повреждению

HISTOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE RAT ADRENAL GLAND AFTER SURGICAL LASER IMPACT

Kemoklidze K.G., Tiulina N.A.

Yaroslavl State Medical Academy, Yaroslavl, e-mail: k_g_k@mail.ru

We performed histological study of surgical laser with 71,25 J impact energy on rat adrenal gland immediately (day 0) and 1 day after manipulation. We found that tissue vaporized and ablation cavity appeared in the area of laser exposure. Distantly there were zones of scab (carbonization and caramelization), vaporization (spongy necrosis) and zones that looks like normal but consisted from fatally damaged cells (thermal fixation). The spongy necrosis zone consisted from two different in their size vacuoles and coloring layers. Photothermal lesion depth was 1–2 mm. At day 0, there was no demarcation between dead and surviving adrenal gland cells without cellular chromaffin reaction. At day 1 (in 50% observations), the demarcation appeared and chromaffin reaction restored together with the appearance and activation of inflammatory cells both in the depth and periphery of the organ. In the second 50% of observations, we discovered that inflammatory cells were active only on the periphery and general histological picture was the same to that of day 0 (sign of organ global thermal fixation). We concluded that applied laser energy has caused the partial survival of adrenal gland parenchyma or total cellular death (ratio of 50/50). More powerful laser energy will cause guaranteed death of adrenal gland parenchyma, whereas smaller energy will allow the survival of parenchyma significant part. This work indicated that the same cells of different populations may have the difference in their photothermal stability. However, we found no selective affection by laser impact of different types of adrenal gland cells.

Keywords: adrenal gland, laser impact on tissue, resistance of cells to photothermal damage

В настоящее время сложилась ситуация, когда успешное и всё более широкое применение лазеров в клинической практике несколько опережает фундаментальные гистологические исследования реакции органов на лазерное повреждение, и она до сих пор считается недостаточно изученной [5]. Сказанное в полной мере относится к такому трудному для исследования, но важному объекту, как надпочечник, лечение лазером которого [1, 6] контрастирует с фактическим отсутствием сведений как о морфологии лазерной де-

струкции данного органа, так и о восстановительных процессах после неё.

Для сглаживания остроты указанной проблемы мы поставили цель изучить гистологическую картину состояния надпочечника непосредственно после воздействия хирургическим лазером и спустя сутки после него.

Материал и методы исследования

Объектом исследования послужили 14 лабораторных белых крыс-самцов линии Wistar массой 348 ± 30 г, у которых с помощью аппарата «Лами» лучом диодного лазера с энергией воздействия

71,25 Дж (длина волны 1020 нм, мощность излучения 2,5 Вт, световод диаметром 400 мкм, продолжительность импульса 190 мс, интервал 10 мс, количество импульсов 150) осуществлялась деструкция части левого надпочечника.

Непосредственно после воздействия и через 1 сутки производили забой крыс передозировкой паров эфира по 7 животных на срок.

Для дифференцировки в мозговом веществе надпочечника двух основных субпопуляций хромаффиноцитов – эпинефроцитов и норэпинефроцитов – применяли метод Нопоре [7], согласно которому материал фиксировали в 5% глутаровом альдегиде, заливали в парафин, а срезы окрашивали сочетанием бихромата калия и толуидинового синего. В результате норэпинефроциты окрашивались в зелёный, а эпинефроциты – в серовато-фиолетовый цвет.

Измерения проводили с помощью окулярных линеек и сеток непосредственно на препаратах и по цифровым фотографиям с использованием программы Fiji (разновидность ImageJ), статистическую обработку осуществляли с помощью программ Универсальный гистологический счётчик [2] и Microsoft Excel.

Результаты исследований и их обсуждение

В указанные сроки обнаружена следующая гистологическая картина.

Непосредственно после воздействия.
В точке приложения лазера с указанными параметрами происходит абляция тканей с образованием каверны объёмом $0,27 \pm 0,08 \text{ мм}^3$ (рис. 1). Края каверны выстланы струпом тёмно-коричневого цвета толщиной от 50 до 100 мкм (обугливание). По мере удаления от края повреждения струп светлеет до золотистого (карамельизация). Под струпом находится зона губчатой консистенции (вапоризация), в котором можно выделить два слоя – наружный и внутренний, резко различающиеся как структурно, так и, с поправкой на использованный метод окраски, тинкториально. Наружный слой является непосредственным продолжением струпа, имеет толщину от 80 до 150 мкм, слабо базофилен, окрашивается в бирюзовый цвет и содержит мелкие вакуоли диаметром до 20 мкм. Клетки в этой зоне полностью разрушены. Внутренний слой имеет толщину 300–400 мкм, интенсивно базофилен, окрашивается в синий цвет, содержит обширные пустотелые вакуоли диаметром до 350 мкм.

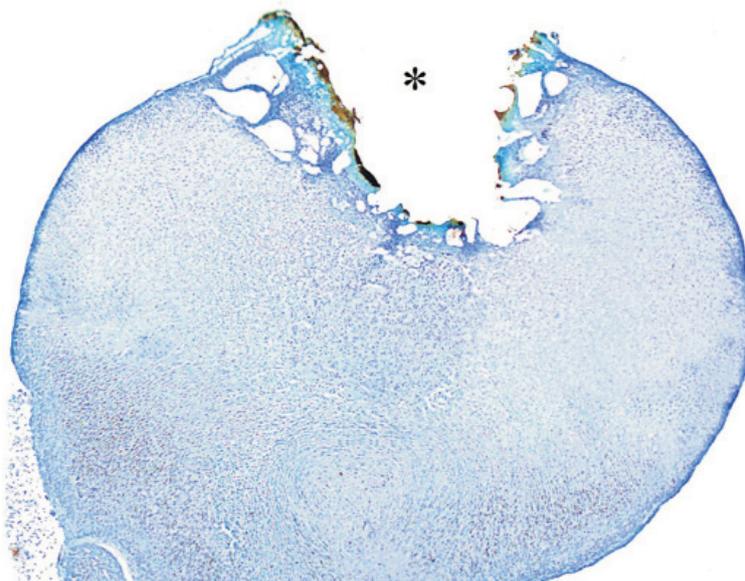


Рис. 1. Надпочечник крысы непосредственно после воздействия лазером:
* – абляционная каверна. Фикс. глут. альдегидом, окр. по Нопоре. Об. $\times 4$, фотонасадка $\times 27$

Стенки вакуолей образованы вытянутыми, деформированными клетками с бледно окрашенной цитоплазмой и удлинёнными интенсивно окрашенными ядрами (рис. 2).

Чёткая граница между погибшими и выжившими клетками отсутствует (рис. 1). Клетки мозгового вещества слабо окрашены, хромаффинная реакция отсутству-

ет, норэпинефроциты и эпинефроциты по окраске не дифференцируются. Нейроны мозгового вещества, напротив, сохраняют интенсивную базофильную окраску с характерными для них базофильными глыбками в цитоплазме, но в этой же локальной точке можно встретить и аномально хромофобные нейроны (рис. 3).

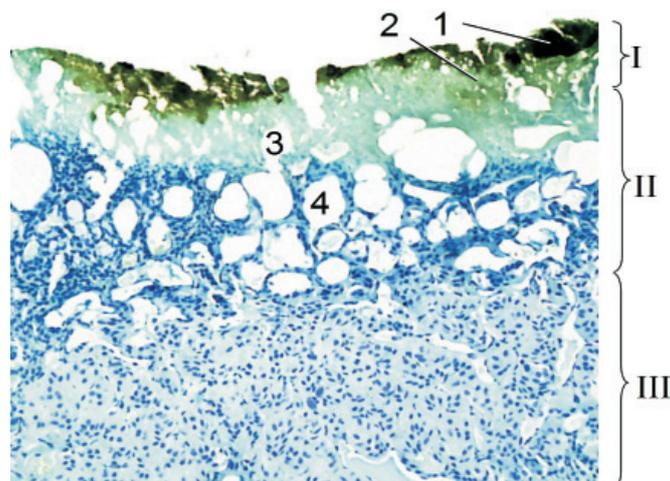


Рис. 2. Край абляционной каверны в надпочечнике крысы после воздействия лазером: I – струя; II – зона губчатого некроза (вапоризация); III – зона компактного некроза; 1 – обугливание; 2 – карамелизация; 3 – микровакулярная зона; 4 – макровакулярная зона. Фикс. глут. альдегидом, окр. по Нопге. Об. $\times 10$, фотонасадка $\times 27$

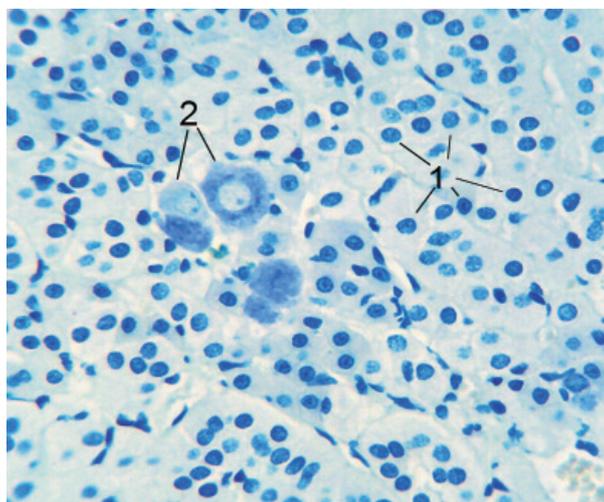


Рис. 3. Мозговое вещество надпочечника крысы после воздействия лазером: 1 – хромофинноциты; 2 – нейроны. Фикс. глут. альд., окр. по Нопге. Об. $\times 40$, фотонасадка $\times 27$

1 сутки. В половине случаев зона некроза резко просветляется и приобретает отчетливую границу. Измеренная по ней глубина лазерного поражения составляет 1–2 мм.

При этом зона некроза заполнена беспорядочно разбросанными клеточными остатками разной степени разрушения и лейкоцитами. Хромаффинная реакция выживших хромофинноцитов восстанавливается, они хорошо прокрашиваются, норэпинефроциты и эпинефроциты легко тинкториально дифференцируются. Некоторые из них, проявившие большую устойчивость, чем соседние оказываются изолированными от основной массы живых клеток в некротической зоне и, напротив, среди выживших клеток встречаются мозаично расположенные погибшие, имеющие пикнотические

ядра и хромофобную цитоплазму. Ряд эндокриноцитов пограничной области показывают промежуточное состояние – имеют четкие контуры, хромофильную цитоплазму, но ядра с признаками пикноза (рис. 4). На периферии органа – в капсуле и по краю абляционной каверны заметен приток и активизация клеток воспаления. Здесь обнаруживаются скопления полиморфноядерных лейкоцитов и освобождающиеся от гранул тучные клетки (рис. 5).

В другой половине случаев просветление зоны некроза не наблюдалось, его граница визуально не определялась. Клетки даже вблизи зоны вapoризации сохраняли целостность, а приток и активизация клеток воспаления были заметны только по периферии органа.

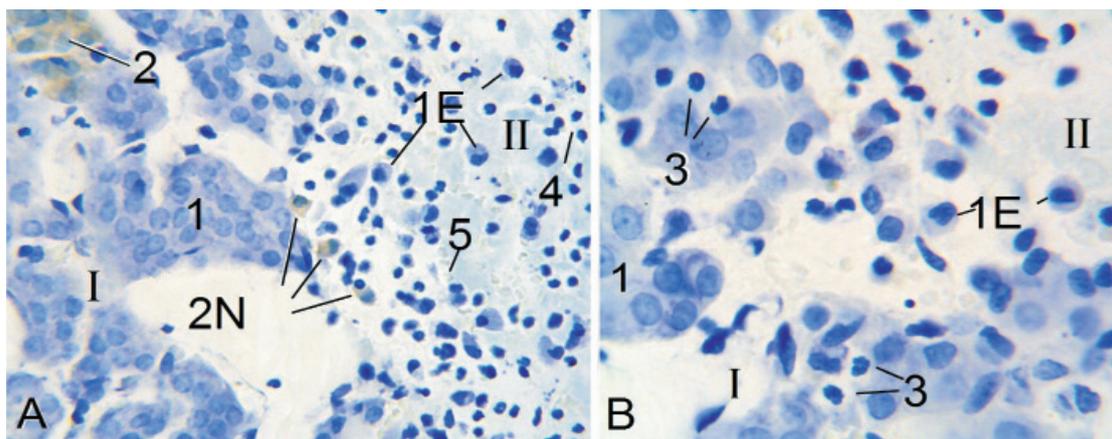


Рис. 4. Пограничная область лазерного повреждения в надпочечнике крысы через 1 сутки после воздействия:

I – зона выживания; II – зона некроза; 1 – эпинефроциты; 2 – норэпинефроциты; 1E – выжившие эпинефроциты в зоне некроза; 2N – выжившие норэпинефроциты в зоне некроза; 3 – погибшие клетки в зоне выживания; 4 – лейкоциты; 5 – эритроциты. Фикс. глут. альд., окр. по Нопоре. А – Об. $\times 40$, фотонасадка 27х, В – Об. $\times 85$, фотонасадка $\times 27$

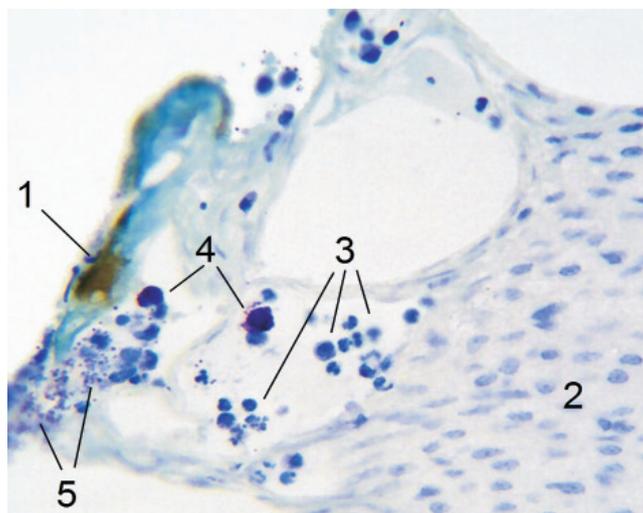


Рис. 5. Край абляционной каверны в надпочечнике крысы через 1 сутки после воздействия лазером: 1 – струп; 2 – некротизированные эндокриноциты; 3 – лейкоциты; 4 – тучные клетки; 5 – выделенные тучными клетками гранулы. Фикс. глут. альд., окр. по Нопоре. Об. $\times 40$, фотонасадка $\times 27$.

Обнаруженная гистологическая картина эффекта фототермического воздействия со стандартными для лазерной хирургии эндокринных желёз параметрами на надпочечник в целом соответствует описанной для других паренхиматозных органов [3, 4, 8]. Сходным является образующаяся в центре воздействия абляционная каверна (результат удаления тканевых масс путём ионизации, сгорания и испарения), затем по мере удаления от неё появление зон карбонизации (редукция органических веществ до угля), карамелизации (плавление сахаров и максимальная денатурация белков) и vaporизации (губчатый слой за счёт об-

разования наполненных паром пузырей), «компактного» некроза (нагрев ниже точки vaporизации), а также отсроченная гибель и распад не убитых сразу, но смертельно повреждённых клеток. Можно отметить, что по отсутствию сразу после повреждения резкой границы между смертельно повреждёнными и жизнеспособными клетками, которая в половине случаев становится отчётливой к 1 суткам, реакция надпочечника ближе к печени, в которой первоначально размытая граница становится резкой в течение первых 3 суток, чем, например, к поджелудочной железе, в которой эта граница рано стабилизируется и к концу первых

суток не претерпевает существенной динамики. Сходную картину для печени и надпочечника легко объяснить сходной консистенцией этих органов. В обоих паренхима образована комплексами эпителиальных клеток, чередующимися с синусоидными капиллярами, а доля волокнистой соединительной ткани невелика. В то же время местное распределение температуры сильно зависит и от природы ткани, и от перфузии в ней крови через сосудистую сеть, и от формы органа [9].

Кроме того, характерной чертой эффекта лазерного воздействия на эндокриноциты мозгового вещества надпочечника является утрата их характерной способности прокрашиваться солями хрома – хромаффинной реакции. В половине случаев к 1 суткам наступает её восстановление. К сожалению, отсутствие отчётливой границы коагуляции сразу после лазерного повреждения не даёт возможности однозначно проиллюстрировать, что это свойство проявляют не только смертельно повреждённые, но ещё не распавшиеся на этот срок клетки, но и клетки, оставшиеся жизнеспособными и впоследствии восстанавливающие нормальное морфофункциональное состояние. Но однородная хромофобность всех мозговых эндокриноцитов, в том числе и находящихся на значительном удалении от центра поражения (более 2 мм), говорит в пользу этого. Так как в контрлатеральных – интактных надпочечниках этого же срока хромаффинная реакция сохраняется, то, очевидно, причиной её утраты в повреждённом органе служит не общая реакция на стресс, а местный температурный шок. Для выяснения механизма его действия на катехоламины в хромаффиноцитах целесообразны дополнительные исследования.

Сам факт присутствия в пограничной зоне погибших эндокриноцитов среди выживших, как и обнаруженная разница в окраске нейронов, является свидетельством неодинаковой фототермической устойчивости клеток даже одной популяции, находящихся в одной точке пространства. В то же время избирательного губительного действия лазера на какие-либо разновидности клеток надпочечника не обнаружено.

Проявившееся на 1 сутки резкое различие в эффекте воздействия хирургического лазера на надпочечник, выразившееся в появлении или отсутствии в половине случаев к концу 1 суток резкой границы некроза и выживания, очевидно, связано с тем, что применённое воздействие со стандартными для эндокринных желёз параметрами в связи с малыми размерами надпочечника кры-

сы привели к избыточному перегреву части органов, что вызвало поражение, включая коагуляцию сосудов, всего их объёма за исключением самой периферии. Более масштабное поражение, в том числе нарушение кровоснабжения, воспрепятствовало проникновению вглубь органа клеток воспаления, ускоренному распаду погибших клеток и разграничению их с выжившими, в результате погибшие клетки остались в состоянии «тепловой фиксации» [10]. Из этого следует, что лазерная энергия выше применённой для данного объёма надпочечника вызовет гарантированную гибель всей паренхимы органа, более низкая – выживание её значительной части.

Выводы

1. В месте воздействия диодным хирургическим лазером с энергией 71,25 Дж происходит испарение ткани надпочечника объёмом $0,27 \pm 0,08$ мм³ и появляется абляционная каверна. По мере удаления от неё возникают зоны карбонизации и карамелизации (струп), зона вапоризации (губчатый некроз) из двух слоёв, отличающихся по размерам вакуолей и тинкториально, и зона внешне целых, но смертельно повреждённых клеток (компактный некроз). Глубина поражения достигает 1–2 мм.

2. Непосредственно после действия лазера отсутствует отчётливая граница между погибшими и выжившими клетками, которая спустя 1 сутки проявляется в половине случаев.

3. Лазерное воздействие вызывает утрату эндокринными клетками мозгового вещества надпочечника характерной хромаффинной реакции, которая в половине случаев восстанавливается к концу 1 суток.

4. Клетки одной и той же популяции могут обладать неодинаковой фототермической устойчивостью, в то же время избирательного действия лазера на ту или иную разновидность клеток надпочечника не обнаружено.

5. Применённая энергия лазерного воздействия вызывает выживание части паренхимы надпочечника или её полную гибель в соотношении 50/50.

Список литературы

1. Лазерная резекция надпочечника / Б.Л. Гамбарин, Р.И. Хамидов, В.А. Хорошаев, А.М. Постолов // Клиническая хирургия. – 1988. – № 12. – С. 33–35.
2. Кемоклидзе К.Г., Тюмина Н.А. Универсальный гистологический счётчик. Версия 2.0 // Морфология. – 2012. – Т. 141. – Вып. 3. – С. 75–76.
3. Елисеенко В.И., Пархоменко Ю.Г. Патогенетические механизмы взаимодействия лазерного излучения с биологическими тканями // Лазеры в хирургии / под ред. О.К. Скобелкина. – М.: Медицина, 1989. – С. 44–49.

4. Пархоменко Ю. Г. Морфология репаративных процессов после операции на паренхиматозных органах // *Лазеры в хирургии* / под ред. О.К. Скобелкина. – М.: Медицина, 1989. – С. 119–128.

5. Welch A.J., van Gemert M.J.C. Overview of optical and thermal laser-tissue interaction and nomenclature // *Optical-thermal response of laser-irradiated tissue* / Ed. Welch A.J., Van Gemert M.J.C. – 2nd ed. – Dordrecht [etc.]: Springer, 2011. – Ch. 1. – P. 3–11.

6. Vogl T.J., Lehnert T., Eichler K., Proschek D., Flöter J., Mack M.G. Adrenal metastases: CT-guided and MR-thermometry-controlled laser-induced interstitial thermotherapy // *Eur. Radiol.* – 2007. – Vol. 17. – P. 2020–2027.

7. Honore L.H. A light microscopic method for the differentiation of noradrenaline and adrenaline producing cells of the rat adrenal medulla // *J.Histochem. and Cytochem.* – 1972. – V. 19. – № 8. – P. 483–486.

8. Thomsen S., Pearce J.A. Thermal Damage and Rate Processes in Biologic Tissues // *Optical-thermal response of laser-irradiated tissue* / Ed. Welch A.J., Van Gemert M.J.C. – 2nd ed. – Dordrecht [etc.]: Springer, 2011. – Ch. 13. – P. 487–549.

9. Valvano J.W. Tissue Thermal Properties and Perfusion // *Optical-thermal response of laser-irradiated tissue* / Ed. Welch A.J., Van Gemert M.J.C. – 2nd ed. – Dordrecht [etc.]: Springer, 2011. – Ch. 12. – P. 455–485.

10. Coad J.E. Thermal fixation: A central outcome of hyperthermic therapies // *Proc. SPIE.* – 2005. – Vol. 5698. – P. 15–22.

References

1. Gambarin B.L., Hamidov R.I., Horoshaev V.A., Postolov A.M. *Klinicheskaya Hirurgiya*, 12 (1988): 33–35.

2. Kemoklidze K.G., Tiumina N.A. *Morfologiya*, 141.3 (2012): 75–76.

3. Eliseenko V.I., Parhomenko Yu.G. Patogeneticheskie Mehanizmy Vzaimodejstviya Lazernogo Izlucheniya s Biologicheskimi Tkanyami [Pathogenetic Mechanisms of Laser Radiation Interaction with Biological Tissues]. *Lazery v Hirurgii*

[*Lasers in Surgery*]. Ed. Skobelkin O.K. Moscow: Medicina, 1989. 44–49.

4. Parhomenko Yu.G. Morfologiya Reparativnyh Processov Posle Operacii na Parenhimatoznyh Organah [Reparative Processes Morphology after Surgery on Parenchymal Organs]. *Lazery v Hirurgii [Lasers in Surgery]*. Ed. Skobelkin O.K. Moscow: Medicina, 1989. 119–128.

5. Welch A.J., van Gemert M.J.C. Overview of Optical and Thermal Laser-tissue Interaction and Nomenclature. *Optical-thermal Response of Laser-irradiated Tissue*. Ed. Welch A.J., Van Gemert M.J.C. 2nd ed. Dordrecht Etc.: Springer, 2011. 3–11.

6. Vogl T.J., Lehnert T., Eichler K., Proschek D., Flöter J., Mack M.G. *Eur. Radiol.*, 17 (2007): 2020–7.

7. Honore L.H. *J.Histochem. and Cytochem.*, 19.8 (1972): 483–486.

8. Thomsen S., Pearce J.A. Thermal Damage and Rate Processes in Biologic Tissues *Optical-thermal Response of Laser-irradiated Tissue*. Ed. Welch A.J., Van Gemert M.J.C. 2nd ed. Dordrecht Etc.: Springer, 2011. 487–549.

9. Valvano J.W. Tissue Thermal Properties and Perfusion *Optical-thermal Response of Laser-irradiated Tissue*. Ed. Welch A.J., Van Gemert M.J.C. 2nd ed. Dordrecht Etc.: Springer, 2011. 455–485.

10. Coad J.E. Thermal fixation: A central outcome of hyperthermic therapies // *Proc. SPIE*, 5698 (2005): 15–22.

Рецензенты:

Гансбургский А.Н., д.м.н., профессор кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии, ГБОУ ВПО «Ярославская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, г. Ярославль;

Румянцева Т.А., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой анатомии человека, ГБОУ ВПО «Ярославская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, г. Ярославль.

Работа поступила в редакцию 11.07.2013.