

СКАНИРУЮЩАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ НАДПОЧЕЧНИКА КРЫСЫ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ХИРУРГИЧЕСКИМ ЛАЗЕРОМ

Кемоклидзе К.Г.¹, Александров Ю.К.¹, Тюмина Н.А.¹, Пухов Д.Э.²

¹ Ярославский государственный медицинский университет, г. Ярославль

² Ярославский филиал Физико-технологического института РАН, г. Ярославль

РЕЗЮМЕ

Цель работы – изучить морфологические изменения, происходящие в надпочечнике после точечного воздействия хирургическим лазером.

Материал и методы. С помощью сканирующей электронной микроскопии в низком вакууме исследованы надпочечники крысы (самцы линии Wistar, $n = 19$) непосредственно после точечного воздействия хирургическим лазером и через 1 мес после него.

Результаты. Непосредственно после воздействия в точке приложения световода обнаруживается абляционный кратер, который имеет неровные края и оплавленную поверхность, пронизанную равноудаленными порами, являющимися следами сети кровеносных сосудов. Под поверхностью кратера располагаются многочисленные вапоризационные пузыри. Поверхность органа вокруг кратера сморщенная и просевшая вследствие снижения способности удерживать воду. Через 1 мес область поражения затянута рубцом, грубые пучки коллагеновых волокон которого оплетают бесформенные глыбки угля и каверны. К рубцу вплотную подходят ткани, имеющие нормальный вид. Сморщивание и проседание поверхности отсутствует. Неповрежденная часть органа сохраняет форму, которую имела до воздействия, поврежденная часть подвергается контракции. Характер восстановительных процессов указывает на низкую вероятность регенерации разрушенной зоны надпочечника после воздействия лазера.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: надпочечник, хирургический лазер, регенерация, сканирующая электронная микроскопия.

Введение

Использование лазерных технологий в последние годы находит все более широкое применение в хирургии, в частности в одном из приоритетных ее направлений – локальном (малоинвазивном) разрушении патологического очага. В связи с этим реакция тканей и органов на локальное воздействие лазерного излучения в хирургическом диапазоне представляет значительный интерес, но при этом все еще остается недостаточно изученной [1]. При этом некоторые органы изучены более подробно [2], другие гораздо в меньшей степени, в их числе надпо-

чечник. Несмотря на то что первые сведения о применении лазера в хирургии надпочечника появились уже четверть века назад [3], подробные фундаментальные исследования, посвященные изучению последствий воздействия на этот орган лазерного излучения в хирургическом диапазоне и результатов восстановительных процессов после него, стали появляться лишь недавно [4–7]. При этом они опираются на данные, полученные на уровне световой микроскопии, а информация об аналогичных наблюдениях с помощью сканирующей электронной микроскопии, позволяющей получить объемное изображение с высоким разрешением, в литературе отсутствует. Цель данного исследования – восполнить указанный пробел.

✉ Кемоклидзе Константин Гербертович, e-mail: K_G_K@mail.ru

Материал и методы

Исследование выполнено на 19 крысах-самцах линии Wistar массой ($335,3 \pm 24,9$) г, которых содержали в стандартных условиях вивария. Обращение с животными соответствовало Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных (Приказ Минздрава СССР № 755 от 12.08.77) и Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях. У 14 из них под общим наркозом проведена точечная лазерная деструкция части левого надпочечника. Для лазерного повреждения применен диодный хирургический лазерный аппарат «Лами» (ООО «Опттехника», Россия) со стандартными для паренхиматозных органов параметрами: точечное однократное контактное воздействие обугленным на конце кварцевым световодом с полиамидным покрытием диаметром 400 мкм (длина волны – 1020 нм, мощность излучения – 2,5 Вт). Указанные параметры работы лазера были заданы особенностями конструкции аппарата «Лами». Энергия воздействия составила 71,25 Дж: 150 импульсов с длительностью 190 мс с интервалом 10 мс (данные параметры выставлялись в ручном режиме на основании предварительных исследований [4–6]). Непосредственно после воздействия и через 1 мес после него животных выводили из эксперимента по семь особей на срок и производили забор надпочечников. Контролем служили надпочечники пяти интактных крыс этой же группы.

Надпочечники фиксировали в 2,5%-м глutarовом альдегиде на фосфатном буфере 24 ч. После фиксации надпочечники каждого срока отмывали в фосфатном буфере и изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа Quanta 3D 200i (FEI™, Нидерланды) в режиме низкого вакуума (НВСЭМ) при давлении водяных паров 70–130 Па. Предварительной заморозки, сушки и нанесения электропроводящего покрытия не применялось. Микроскопия проводилась в лаборатории Центра коллективного пользования научным оборудованием «Диагностика микро- и наноструктур» Ярославского филиала Физико-технологического института РАН.

Результаты

Интактный надпочечник крысы имеет форму вытянутого сфероида объемом ($10,3 \pm 2,5$) мм³ и равномерно выпуклую матовую поверхность (рис. 1). Непосредственно после лазерного воздействия в месте приложения световода обнару-

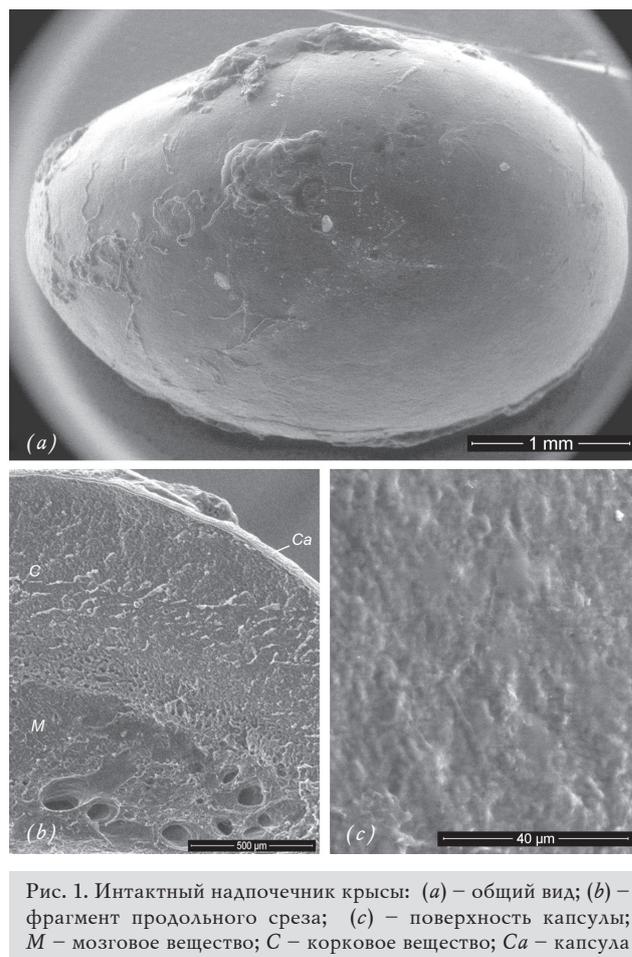


Рис. 1. Интактный надпочечник крысы: (a) – общий вид; (b) – фрагмент продольного среза; (c) – поверхность капсулы; М – мозговое вещество; С – корковое вещество; Ca – капсула

живается абляционный кратер в расширенной части около 700 мкм и такой же глубины (рис. 2a). Учитывая взрывной характер лазерной абляции и внешний вид образующегося при точечном воздействии повреждения, термин «кратер» представляется нам более точным, нежели нейтральный – «воронка». Края кратера неровные, внутренняя поверхность оплавлена и равномерно с интервалами около 40 мкм покрыта порами диаметром от 6 мкм (рис. 2b, P). В зоне поражения, простирающейся на расстояние до 700 мкм от края воронки, поверхность органа покрыта мелкими морщинами толщиной ($6,4 \pm 1,6$) мкм (рис. 2c). Зона поражения сильно проседает относительно неповрежденных участков, в результате чего отделяется от них глубокой бороздой (рис. 2a, Br). Под поверхностью воронки обнаруживаются варьирующие по размерам полости, самые крупные из которых достигают 300 мкм. Стенки полостей имеют грубые очертания и волокнистую структуру (рис. 2d).

Через 1 мес после воздействия хирургическим лазером обнаруживается, что область приложения световода затянута рубцом (рис. 3a), грубые

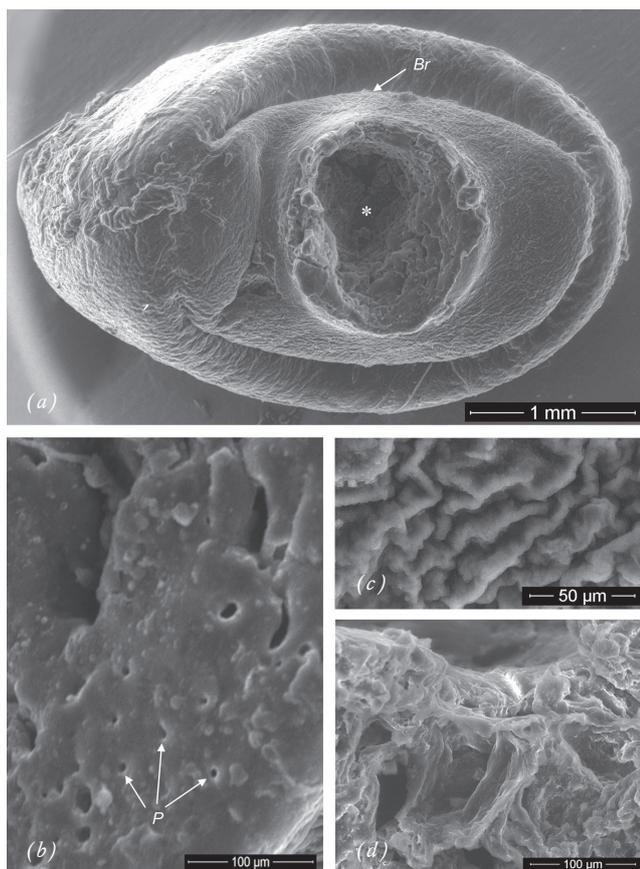


Рис. 2. Надпочечник крысы непосредственно после воздействия хирургическим лазером: (а) – общий вид; (б) – поверхность абляционного кратера; (с) – поверхность капсулы вокруг кратера; (д) – губчатая зона под поверхностью кратера; * – точка воздействия; Br – граница зоны повреждения; P – равноудаленные поры

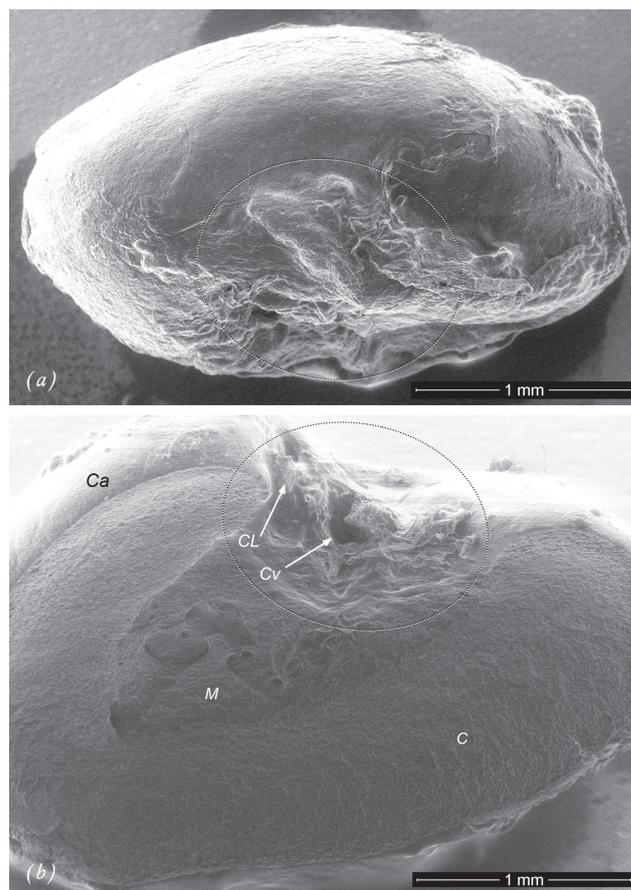


Рис. 3. Надпочечник крысы через 1 мес после воздействия хирургическим лазером: (а) – общий вид; (б) – продольный срез; пунктиром выделена область поражения, замещенная рубцовой тканью; М – мозговое вещество; С – корковое вещество; Ca – капсула; CL – глыбка угля; Cv – каверна

пучки коллагеновых волокон которого оплетают бесформенные глыбки угля и каверны (рис. 3б, CL и Cv). К рубцу вплотную подходят ткани, имеющие нормальный вид. Это относится к поверхностной и к внутренней части органа (рис. 3б). Сморщивание и проседание поверхности, разграничительная борозда отсутствуют. Так же хорошо видно, что выжившая после повреждения часть надпочечника сохранила свои очертания, в то время как поврежденная часть органа подверглась контракции. В результате надпочечник в целом приобретает усеченный по сравнению с интактным органом вид.

Обсуждение

По данным световой микроскопии в надпочечнике непосредственно после точечного повреждения хирургическим лазером со стандартными для паренхиматозных органов параметрами возникает абляционный кратер (тканевые массы сгорают и испаряются), поверхность которого

покрыта плотным лазерным струпом. По мере удаления от зоны абляции можно различить зоны карбонизации (превращение органических веществ в уголь) и карамелизации (плавление сахаров и максимальная денатурация белков), vaporизации (область губчатой консистенции, образующаяся за счет образования множества наполненных газами пузырей), «компактного» некроза (смертельный нагрев без образования пузырей) и зона выживания [4–6]. Полученное с помощью НВСЭМ объемное изображение с высоким разрешением области лазерного воздействия с такими же параметрами дополняет эту картину рядом важных деталей. В частности, внешний вид кратера, имеющего неровные приподнятые края и оплавленную пористую поверхность, хорошо иллюстрирует взрывной характер абляции и сильный точечный нагрев. Появление пор на поверхности воронки, очевидно, является местом выхода газов, образующихся при закипании жидких тканевых компонентов. Обращает

на себя внимание одинаковый диаметр и равноудаленное расположение многих из них, что говорит о привязке мест выхода газов к какой-то упорядоченной структуре в коре. Такой упорядоченной структурой со всей очевидностью является сосудистая сеть. Известно, что под капсулой надпочечника капилляры анастомозируют друг с другом, образуют равномерную решетку, а затем резко меняют направление и уходят в глубину коры перпендикулярно поверхности надпочечника [8]. При этом местное распределение температуры при лазерном поражении сильно зависит от перфузии крови в данной области [9], а надпочечник отличается исключительно богатым кровоснабжением: относительная величина кровотока в нем – одна из самых высоких в организме [10]. Возникающая в НВСЭМ картина хорошо иллюстрирует важную роль упомянутых выше капилляров при распространении в глубину надпочечника теплового поражения, которое в данном случае затрагивает всю толщу коры и достигает мозгового вещества.

Вызывает вопросы наблюдающееся в НВСЭМ сильное проседание поверхности надпочечника вокруг лазерного кратера с образованием мощной окаймляющей борозды или складки на границе с неповрежденными участками. Изучение поверхности места лазерного поражения в световой стереомикроскоп до того, как орган помещен в смотровую камеру электронного микроскопа, показывает, что зона повреждения четко выделяется цветом. Абляционный кратер вследствие обугливания имеет черную окраску, а область вокруг нее беловатую, однако проседание поверхности и окаймляющая складка отсутствуют. На срезах для просвечивающей световой микроскопии их также нет [4]. Таким образом, данный феномен является артефактом именно НВСЭМ. В условиях смотровой камеры НВСЭМ проседание (то есть локальное снижение уровня) и сморщивание поверхности органа вокруг абляционного кратера может быть вызвано только уменьшением объема тканей вследствие потери влаги. При этом локализация этого явления только вокруг абляционного кратера показывает, что поврежденная область теряет воду гораздо сильнее, чем неповрежденная. Известно, что снижение способности эффективно удерживать воду является характерным последствием фототермического воздействия, вызываемого денатурацией связывающих воду белков, глико- и липопротеинов, которая также приводит к изменению цвета и прозрачности поврежденной области [11]. Таким образом, можно утверждать, что наблюдаемый в НВСЭМ артефакт проседания

и сморщивания зоны лазерного поражения связан именно с потерей воды денатурированными белками и их производными.

Изучение надпочечника через 1 мес после точечного воздействия хирургическим лазером позволяет оценить регенеративную способность органа в ответ на этот вид повреждения. По данным световой микроскопии, в этот срок на месте воздействия формируется зрелая рубцовая ткань, в толще которой сохраняются плотные фрагменты лазерного струпа и кистозные образования, заполненные рыхлыми остатками губчатого некроза. Выжившая часть органа сохраняет свою форму и не гипертрофируется, поврежденная часть подвергается контракции [6], в результате общий объем надпочечника сокращается на 2/3 и более раз. Наблюдение в НВСЭМ наглядно подтверждает эти данные, а также в свете обсуждавшихся выше фактов, касающихся снижения способности поврежденных лазером тканей удерживать воду, показывает, что после 1 мес регенерации эта способность полностью восстановлена, так как проседание поверхности, окаймляющая складка, сморщивание капсулы не обнаруживаются. В целом характер восстановительных процессов указывает на низкую вероятность регенерации разрушенной зоны надпочечника после воздействия лазера.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Литература

1. *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.
2. *Неворотин А.И.* Введение в лазерную хирургию. СПб.: СпецЛит, 2000.
3. *Гамбарин Б.А., Хамидов Р.И., Хорошаев В.А., Постолов А.М.* Лазерная резекция надпочечника // *Клиническая хирургия*. 1988. № 12. С. 33–35.
4. *Кемоклидзе К.Г., Тюмина Н.А.* Гистологическая характеристика надпочечника крысы после воздействия хирургическим лазером // *Фундаментальные исследования*. 2013. Т. 8, ч. 4. С. 886–891.
5. *Кемоклидзе К.Г., Тюмина Н.А.* Гистологическая характеристика надпочечника крысы после воздействия хирургическим лазером на среднесрочном этапе // *Фундаментальные исследования*. 2013. Т. 10, ч. 5. С. 1084–1089.

6. Кемоклидзе К.Г., Александров Ю.К., Дворников М.В., Тюмина Н.А. Гистологическая характеристика надпочечника крысы после воздействия хирургическим лазером на позднем этапе // *Фундаментальные исследования*. 2013. Т. 10, ч. 14. С. 3087–3092.
7. Кемоклидзе К.Г., Тюмина Н.А. Динамика количественных показателей мозгового вещества надпочечника крысы после частичной лазерной деструкции // *Морфология*. 2014. Т. 146, вып. 6. С. 63–67.
8. Nakamura K., Masuda T. Scanning Electron Microscopy of Corrosion Cast of Rat Adrenal Vasculatures with Emphasis on Medullary Artery under ACTH Administration // *Tohoku J. Exp. Med.* 1981. V. 134. P. 203–213.
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. Sparrow R.A., Coupland R.E. Blood flow to the adrenal gland of the rat: its distribution between the cortex and the medulla before and after haemorrhage // *J. Anat.* 1987. V. 155. P. 51–61.
11. Thomsen S., Pearce J.A. Thermal Damage and Rate Processes // *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.

Поступила в редакцию 28.12.2015 г.

Утверждена к печати 15.03.2016 г.

Кемоклидзе Константин Гербертович (✉) – канд. биол. наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Ярославского государственного медицинского университета (г. Ярославль).

Александров Юрий Константинович – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой хирургических болезней педиатрического факультета Ярославского государственного медицинского университета (г. Ярославль).

Тюмина Наталья Андреевна – аспирант кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Ярославского государственного медицинского университета (г. Ярославль).

Пухов Денис Эдуардович – канд. биол. наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории ЦКП «Диагностика микро- и наноструктур» Ярославского филиала Физико-технологического института РАН (г. Ярославль).

✉ Кемоклидзе Константин Гербертович, e-mail: K_G_K@mail.ru

Ярославский государственный медицинский университет, 150000, г. Ярославль, ул. Революционная, д. 5, e-mail: rector@yuma.ac.ru

Ярославский филиал Физико-технологического института РАН, 150007, г. Ярославль, ул. Университетская, д. 21, e-mail: vtvmi@rambler.ru

SCANNING ELECTRON MICROSCOPY OF THE RAT ADRENAL GLAND AFTER SURGICAL LASER EXPOSURE

Kemoklidze K.G.¹, Alexandrov Yu.K.¹, Tiumina N.A.¹, Pukhov D.E.²

¹ Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russian Federation.

² Yaroslavl Branch at the Institute of Physics and Technology of the Russian Academy of Sciences, Yaroslavl, Russian Federation.

ABSTRACT

Aim. We studied via low vacuum scanning electron microscopy the effects of a surgical laser exposure to adrenal glands and results of regeneration processes after.

Materials and methods. Purpose of this work is modeling of effects of the removal with a surgical laser a pathological focus in the adrenal glands. For this Wistar male rat (n = 19) adrenal glands were researched without the laser exposure, immediately after it and 1 month later.

Results. Immediately after exposure occurs laser ablation crater with rough edges and melted surface penetrated by equidistant pores, which are footprints of blood vessels. Beneath of the surface are numerous vaporization

bubbles. Around the crater, the surface wrinkles and sags due to decreased ability to retain water. 1 month after the laser damage, the affected area tightened by a scar. Its coarse bundles of collagen fibers braid shapeless lumps of coal and caverns. Tissues with normal appearance are close to the scar, both outside and inside of the organ. The wrinkling and the sagging are absent. The undamaged organ part has retained the previous shape, without hypertrophies. The damaged part has shrunk. The nature of the regeneration processes indicates a low probability of a relapse after the destruction of a pathological focus via the surgical laser exposure.

KEY WORDS: adrenal gland, surgical laser exposure, laser damage, reparation and regeneration, low vacuum scanning electron microscopy.

Bulletin of Siberian Medicine, 2016, vol. 15, no. 2, pp. 46–50

References

1. 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. pp. 3–11.
2. Nevrotin A.Y. Introduction to laser surgery. SPb.: SpezhLit Publ., 2000 (in Russian).
3. Gambarin B.L., Khamidov R.I., Khoroshaev V.A., Postolov A.M. Lazernaya rezektsiya nadpochechnika [Laser resection of the adrenal gland]. *Klinicheskaya khirurgiya - Clinical surgery*, 1988, no. 12, pp. 33–35 (in Russian).
4. Kemoklidze K.G. & Tiumina N.A. Gistologicheskaya kharakteristika nadpochechnika krysy posle vozdeystviya khirurgicheskim lazerom [Histological characteristics of the rat adrenal gland after surgical laser impact]. *Fundamentalnie issledovaniya – Fundamental research*, 2013, vol. 8, part 4, pp. 886–891 (in Russian).
5. Kemoklidze K.G. & Tiumina N.A. Gistologicheskaya kharakteristika nadpochechnika krysy posle vozdeystviya khirurgicheskim lazerom na srednesrochnom etape [Histological characteristics of the rat adrenal gland after surgical laser impact at midpoint stage]. *Fundamentalnie issledovaniya – Fundamental research*, 2013, vol. 10, part 5, pp. 1084–1089 (in Russian).
6. Kemoklidze K.G., Aleksandrov Y.K., Dvornikov M.V. & Tiumina N.A. Gistologicheskaya kharakteristika nadpochechnika krysy posle vozdeystviya khirurgicheskim lazerom na pozdnem etape [Histological properties of rat adrenal gland after surgical laser impact at a later stage]. *Fundamentalnie issledovaniya – Fundamental research*, 2013 vol. 10, part 14, pp. 3087–3092 (in Russian).
7. Kemoklidze K.G. & Tiumina N.A. Dinamika kolichestvennykh pokazateley mozgovogo veshchestva nadpochechnika krysy posle chastichnoy lazernoy destruktssii [The dynamics of quantitative parameters of rat adrenal medulla after its partial laser destruction]. *Morfologiya – Morphology*, 2014, vol. 146, issue 6, pp. 63–67 (in Russian).
8. Nakamura K., Masuda T. Scanning Electron Microscopy of Corrosion Cast of Rat Adrenal Vasculatures with Emphasis on Medullary Artery under ACTH Administration // *Tohoku J. Exp. Med.* 1981. Vol. 134. P. 203–213.
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. Sparrow R.A., Coupland R.E. Blood flow to the adrenal gland of the rat: its distribution between the cortex and the medulla before and after haemorrhage // *J. Anat.* 1987. V. 155. P. 51–61.
11. Thomsen S., Pearce J.A. Thermal Damage and Rate Processes // 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.

Kemoklidze Konstantin G. (✉), Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russian Federation.

Aleksandrov Yuri K., Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russian Federation.

Tiumina Natalia A., Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russian Federation.

Pukhov Denis E., Yaroslavl Branch of the Institute of Physics and Technology of the Russian Academy of Sciences, Yaroslavl, Russian Federation.

✉ **Kemoklidze Konstantin G.**, e-mail: K_G_K@mail.ru

Yaroslavl State Medical University, 5, Revolutsionnaya St., Yaroslavl, 150000, e-mail: k_g_k@mail.ru.

Yaroslavl Branch at the Institute of Physics and Technology of the Russian Academy of Sciences, 21, Universitetskaya St., Yaroslavl, 150007, e-mail: vtvimi@rambler.ru.