

УДК 611.018.1:616.002.16:615.849.19

Астахова Л.В., Игнатьева Е.Н., Головнева Е.С., Гиниатуллин Р.У., Кравченко Т.Г.

Морфофункциональные изменения в очагах лазерной деструкции печени, почки, селезенки (экспериментальное исследование)

Astakhova L.V., Ignatieva E.N., Golovneva E.S., Giniatullin R.U., Kravchenko T.G.

Morphofunctional changes in laser-destroyed foci in the liver, kidney, spleen (an experimental study)

ГБУЗ ЦОСМП «Челябинский государственный институт лазерной хирургии», г. Челябинск

Сравнительное изучение морфофункциональных изменений в очагах деструкции печени, почки, селезенки высокоинтенсивным непрерывным лазерным излучением было произведено в ГБУЗ ЦОСМП «Челябинский государственный институт лазерной хирургии». У 20 крыс в печени, почке, селезенке выполняли лазерную деструкцию с поверхности органа, контактно. Длина волны излучения – 0,97 мкм в непрерывном режиме мощностью 2 Вт, время воздействия – 10 сек. Сроки исследования – 1 час, 1 сут. Использовались гистологические, морфометрические, статистические методы исследования. Измеряли ширину зоны деструкции, подсчитывали количество тучных клеток (общее, целых – Н, дегранулированных – Д). Определяли индекс их дегрануляции по формуле: $ID = D / (D + H)$. Выявлено, что во всех исследуемых органах очаги лазерной деструкции имели чашеобразную форму, зональное строение и сопоставимые значения общей ширины. В области деструкции печени и почки наблюдалось усиление функциональной активности тучных клеток, происходило увеличение их количества и усиление дегрануляции, что указывает на высокую скорость репарации тканей. В случае резекции селезенки такого эффекта не наблюдалось, следовательно, в восстановлении тканей этого органа тучные клетки ведущей роли не играют. *Ключевые слова:* лазер, деструкция, тучные клетки, паренхиматозные органы.

A comparative study of morphological and functional changes in laser-destroyed foci in the liver, kidneys and spleen was performed in Chelyabinsk State Institute of Laser Surgery. High-level continuous laser radiation was used. Contact laser destruction of the liver, kidneys, spleen was done from the surface of the organ in the contact mode in 20 rats. Radiation was continuous with wavelength 0.97 μm , power 2 W, exposure time 10 sec. Result were assessed in one hour and one day after. Histological, morphometric and statistical methods were used for this. Destroyed area was measured; the number of mast cells was counted (total, intact – I, degranulated – D). The index of degranulation (ID) was determined as: $ID = D / (D + I)$. It was found out that the foci destroyed by laser light were cup-shaped in all investigated organs; they had zonal structure and comparable values of the total width. Functional activity of mast cells in lesions was increased in the liver and kidneys; there was also an increased number of mast cells and increased level of degranulation, what demonstrated a high rate of tissue reparation. In case of spleen resection, there was no such effects. Mast cells are likely not to play a leading role in this organ reparation. *Key words:* laser destruction, mast cells, parenchymal organs.

Актуальность

В современной хирургии получили достаточное распространение лазерные малоинвазивные органосохраняющие технологии (при удалении очаговых образований внутренних органов). Эффективность таких вмешательств, в основном, достигается за счет термического действия высокоинтенсивного лазерного излучения. Быстрота и способность достижения того или иного уровня температуры зависят от параметров лазерного излучения и свойств самих тканей [2, 4, 5, 7]. Остается невыясненным, можно ли использовать одинаковые режимы лазерного воздействия при очаговой деструкции органов, существенно отличающихся по гистологическому строению, будут ли наблюдаемые в тканях морфологические изменения однотипны на ранних стадиях репарации. Тучные клетки, благодаря своей дегрануляции в ответ на лазерное воздействие, являются своеобразным маркером начальных этапов репарации тканей после лазерной деструкции [3]. Кроме того, тучные клетки способны взаимодействовать со всеми участвующими в репарации клеточными популяциями, ведущими из которых являются мононуклеарные фагоциты, роль которых в заживлении лазерной раны была убедительно доказана В.И. Елисеенко [1, 4]. Однако особенности реакции тучных клеток различных тканей на лазерное воздействие не были исследованы.

Целью работы являлось сравнительное изучение морфофункциональных изменений в очагах деструкции печени, почки, селезенки при воздействии высокоинтенсивным непрерывным лазерным излучением.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проводили на 20 беспородных крысах с применением лазерного излучения длиной волны 0,97 мкм в непрерывном режиме генерации (полупроводниковый лазерный скальпель ЛС-0,97-«ИРЭ-Полус», г. Фрязино, Россия). Лазерную деструкцию в печени, почке, селезенке осуществляли контактным способом с поверхности органа. Мощность излучения – 2 Вт, время облучения – 10 с. Для доставки излучения использовали моноволоконный световод с тефзелевым покрытием, диаметр светонесущей жилы – 600 мкм.

Морфологические изменения в тканях изучали на парафиновых срезах после окрашивания гематоксилином-эозином и толуидиновым синим с pH 2,0. Микроскопическое изучение гистологических срезов проводили на микроскопе Leica DMRXA (Германия). Морфометрическое исследование осуществляли с помощью компьютерной программы анализа изображений «ДиаМорф Cito_W», (Москва, Россия). Произведено измерение ширины очага деструкции, подсчет общего количества, количества целых и дегранулированных тучных клеток

и индекс их дегрануляции. Индекс дегрануляции рассчитывали по формуле:

$$\text{ИД} = \frac{Д}{Д + Н},$$

где Д – количество дегранулированных, Н – количество недегранулированных тучных клеток. Животных выводили из эксперимента через 1 час и 1 сут.

Полученные данные статистически обработаны методами вариационной статистики с помощью программы Statistica 6.

Результаты исследования

Через **1 час** после лазерного воздействия в очагах деструкции паренхиматозных органов отчетливо выявлялись следующие зоны: центральная зона обугливания (карбонизации), зона первичного термического повреждения, пограничная (перифокальная зона). Во всех органах очаги имели чашеобразную форму, основанием обращенную к капсуле органа (рис. 1, а).

В центральной зоне обугливания прослеживались участки лазерной абляции ткани округлой формы, выполненные белковой жидкостью и массами ярко-оранжевых компактно лежащих эритроцитов с равномерно распределенными клетками белой крови на их фоне (рис. 1, б).

Далее располагалась зона первичного термического повреждения, которая была представлена венчиком паренхимы с морфологическими признаками действия высоких температур: в этом слое четко прослеживались все структурные опознавательные элементы паренхимы и стромы органов. Клетки были несколько уменьшены в объеме, с усилением восприятия кислых и основных красителей, ядра клеток так же несколько уменьшены в объеме, густо закрашены. В сосудах – компактные массы ярко-оранжевых эритроцитов с равномерно распределенными клетками белой крови на их фоне. Исключением являлась зона первичного термического воздействия в селезенке, где хорошо прослеживалась структура белой пульпы и ретикулярной ткани, а эритроциты хорошо контурировались лишь в сосудах среднего и мелкого калибра, во время как синусоиды красной пульпы были оптически пусты (рис. 1, в).

Границы между очагами лазерной деструкции и неизменной паренхимой во всех органах были очень четкими, хотя реактивные изменения в пограничных зонах были минимальными и заключались в паретическом венозном и капиллярном полнокровии, незначительном отеке межтучной ткани и начальных явлениях лейкостазов в сосудах с краевым стоянием лейкоцитов (рис. 1, г).

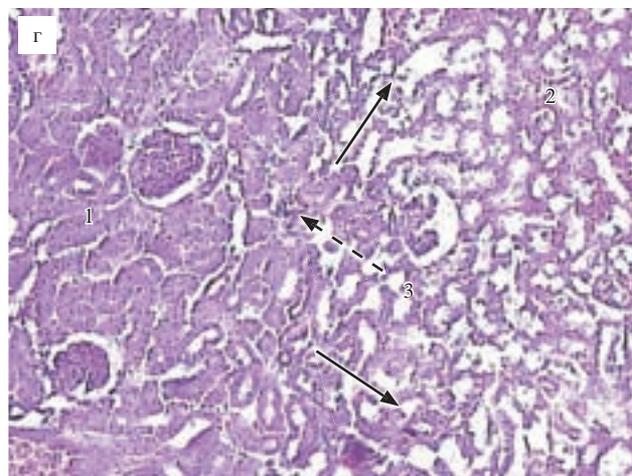
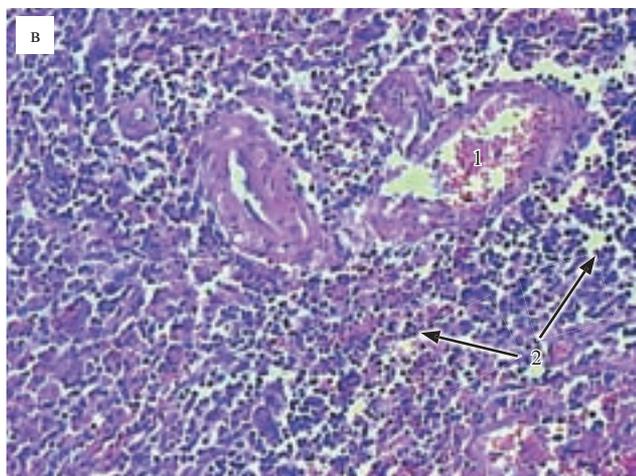
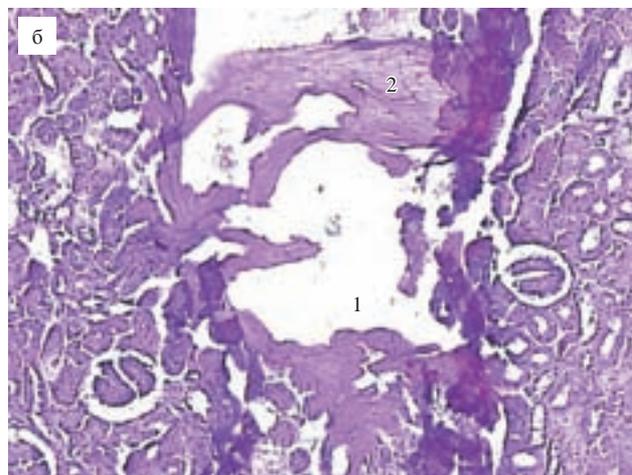
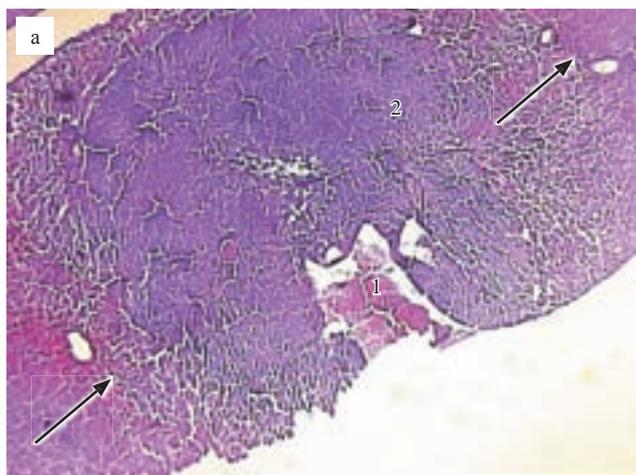


Рис. 1. Очаги лазерной деструкции в различных паренхиматозных органах через 1 час после воздействия: а – печень: в очаге лазерного воздействия видны зоны карбонизации (1) и зона первичного термического повреждения (2); границы с неизменной паренхимой отмечены стрелками, $\times 50$; б – почка: центр очага (1) заполнен белковой жидкостью (2), $\times 200$; в – селезенка: в зоне первичного термического воздействия определяются заполненные кровью артерии мелкого калибра (1) на фоне малокровных синусоидов красной пульпы (2), $\times 400$; г – почка: сплошными стрелками указана граница очага лазерного воздействия (1) с неизменной паренхимой (2); в сосудах мелкого калибра (3, пунктирная стрелка) – явления лейкостазов, $\times 200$. Окраска гематоксилин-эозином

Линейные размеры зон очагов лазерной деструкции в различных органах имели сопоставимые значения (табл. 1).

В очагах лазерной деструкции тучные клетки регистрировались преимущественно в дегранулированном состоянии, а их количество увеличивалось по направлению от центра очага к интактной паренхиме. В центрах лазерных очагов встречались немногочисленные дегранулированные тучные клетки. В зоне первичного термического воздействия эти клетки локализовались в структурах с большим количеством соединительной ткани. В перифокальной зоне количество тучных клеток было наибольшим, и обнаруживались они как в соединительнотканых структурах, так и среди паренхиматозных клеток (табл. 2–4).

Индекс дегрануляции тучных клеток во всех зонах очагов лазерной деструкции был высоким и не зависел от органа, на котором выполнялось лазерное воздействие (табл. 5).

Через 1 сут в очагах лазерной деструкции всех паренхиматозных органов отчетливо выявлялись следующие зоны: центральная зона обугливания (карбонизации), зона первичного термического воздействия, зона некроза, пограничная (перифокальная зона). В центральных зонах (зонах обугливания) очагов лазерной деструкции в течение суток уменьшалось количество частиц ожогового струпа. Участок лазерной абляции заполнен компактно или рыхло лежащими, частично гемолизированными эритроцитами бледно-оранжевого цвета с нечеткими контурами отдельных клеток (рис. 2, а, б).

Таблица 1

Морфометрическая характеристика зон очагов деструкции через 1 час и 1 сут после воздействия непрерывным лазерным излучением (M ± m), мкм

	Зона обугливания	Зона первичного термического повреждения и некроза	Перифокальная зона	Средний радиус очага
Печень, 1 час	190,10 ± 12,59	461,67 ± 28,05	196,89 ± 19,99	848,67 ± 55,86
Печень, 1 сут	238,46 ± 20,58	892,31 ± 45,98	378,43 ± 15,28	1509,20 ± 68,29
Почка, 1 час	218,44 ± 16,54	528,87 ± 18,86	295,90 ± 14,30	1043,21 ± 25,95
Почка, 1 сут	275,70 ± 18,28	983,59 ± 23,79	335,29 ± 16,45	1594,57 ± 28,43
Селезенка, 1 час	275,66 ± 16,42	628,04 ± 38,07	273,93 ± 17,81	1177,64 ± 69,08
Селезенка, 1 сут	296,16 ± 23,10	1007,89 ± 29,39	338,16 ± 21,51	1642,52 ± 60,80

Таблица 2

Общее количество тучных клеток в 1 мм² гистологического среза в зонах очагов деструкции, через 1 час и 1 сут после воздействия непрерывным лазерным излучением

	Зона обугливания	Зона первичного термического повреждения и некроза	Перифокальная зона	Интактная паренхима
Печень, 1 час	4,04 ± 1,35	31,48 ± 4,88	47,62 ± 4,25	109,78 ± 6,16
Печень, 1 сут	17,94 ± 3,50	44,84 ± 6,47	83,41 ± 9,32	82,51 ± 8,38
Почка, 1 час	4,48 ± 1,42	30,49 ± 4,99	42,15 ± 2,94	61,88 ± 6,86
Почка, 1 сут	14,13 ± 2,02	32,28 ± 4,23	60,54 ± 5,21	58,52 ± 8,95
Селезенка, 1 час	1,08 ± 0,72	11,30 ± 3,00	12,92 ± 3,03	28,14 ± 5,67
Селезенка, 1 сут	2,06 ± 1,57	13,07 ± 4,96	17,32 ± 4,66	37,76 ± 7,21

Таблица 3

Количество целых тучных клеток в 1 мм² гистологического среза в зонах очагов деструкции через 1 час и 1 сут после воздействия непрерывным лазерным излучением

	Зона обугливания	Зона первичного термического повреждения и некроза	Перифокальная зона	Интактная паренхима
Печень, 1 час	0,00 ± 0,00	8,88 ± 1,88	13,72 ± 1,23	84,75 ± 4,70
Печень, 1 сут	0,00 ± 0,00	11,66 ± 2,73	27,80 ± 4,06	61,88 ± 6,59
Почка, 1 час	0,00 ± 0,00	8,07 ± 1,90	11,66 ± 1,42	46,64 ± 4,99
Почка, 1 сут	0,00 ± 0,00	10,09 ± 2,02	16,14 ± 3,30	44,39 ± 6,99
Селезенка, 1 час	0,00 ± 0,00	2,42 ± 1,13	3,39 ± 1,14	22,12 ± 4,74
Селезенка, 1 сут	0,00 ± 0,00	2,42 ± 1,23	4,88 ± 1,54	28,88 ± 5,55

Таблица 4

Количество дегранулированных тучных клеток в 1 мм² гистологического среза в зонах очагов деструкции через 1 час и 1 сут после воздействия непрерывным лазерным излучением

	Зона обугливания	Зона первичного термического повреждения и некроза	Перифокальная зона	Интактная паренхима
Печень, 1 час	4,04 ± 1,35	22,60 ± 3,14	33,90 ± 3,14	25,02 ± 1,88
Печень, 1 сут	17,94 ± 3,50	33,18 ± 4,13	55,61 ± 6,37	20,63 ± 1,95
Почка, 1 час	4,48 ± 1,42	22,42 ± 3,23	30,49 ± 1,79	15,25 ± 2,10
Почка, 1 сут	14,13 ± 2,02	22,20 ± 2,02	44,39 ± 4,04	14,13 ± 2,02
Селезенка, 1 час	1,08 ± 0,72	8,88 ± 2,66	9,53 ± 2,32	6,02 ± 1,39
Селезенка, 1 сут	2,06 ± 1,16	10,65 ± 3,83	12,44 ± 3,38	8,88 ± 2,07

Таблица 5

Индекс дегрануляции тучных клеток в зонах очагов деструкции, выполненных через 1 час и 1 сут после воздействия непрерывным лазерным излучением

	Зона обугливания	Зона первичного термического повреждения и некроза	Перифокальная зона	Интактная паренхима
Печень, 1 час	1,00 ± 0,00	0,76 ± 0,04	0,71 ± 0,01	0,23 ± 0,01
Печень, 1 сут	1,00 ± 0,00	0,75 ± 0,02	0,67 ± 0,02	0,25 ± 0,01
Почка, 1 час	1,00 ± 0,00	0,78 ± 0,04	0,73 ± 0,02	0,24 ± 0,01
Почка, 1 сут	1,00 ± 0,00	0,69 ± 0,02	0,74 ± 0,02	0,24 ± 0,01
Селезенка, 1 час	1,00 ± 0,00	0,79 ± 0,02	0,74 ± 0,03	0,21 ± 0,01
Селезенка, 1 сут	1,00 ± 0,00	0,81 ± 0,02	0,72 ± 0,01	0,23 ± 0,01

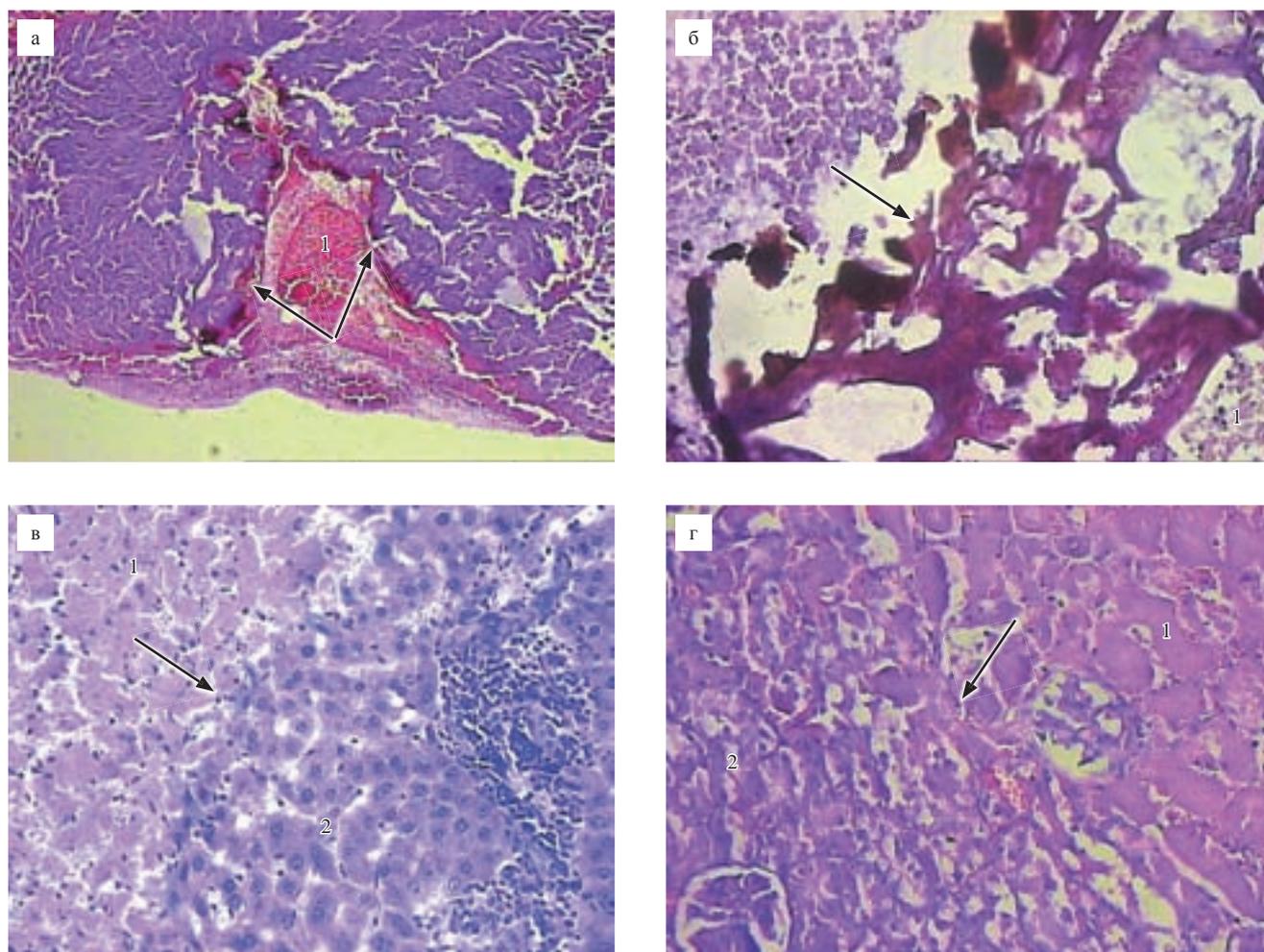


Рис. 2. Очаги лазерной деструкции в различных паренхиматозных органах через 1 сут после воздействия: а – печень: в центре очага деструкции – частицы ожогового струпа (стрелки) и компактные массы частично гемолизированных эритроцитов (1); б – селезенка: в центре очага – частицы ожогового струпа (стрелка) и рыхлые массы эритроцитов (1); в – печень: граница (стрелка) очага некроза (1) с неизменной паренхимой (2), ×400; г – почка: граница (стрелка) очага некроза (1) с неизменной паренхимой (2), ×400. Окраска гематоксилин-эозином

В зоне первичного термического повреждения существенной динамики по сравнению с предыдущим сроком исследования не было. Между зоной первичного термического повреждения и перифокальной зоной располагалась зона некроза. В этом участке ядра клеток были полностью утрачены, погибшие клетки несколько увеличены в объеме, однородные, интенсивно-розового цвета. Граница между зонами была выражена отчетливо. В перифокальной зоне определялось полноцение капилляров и вен с картиной лейкостазов и миграцией лейкоцитов за пределы сосудистых стенок с формиро-

ванием узкого демаркационного лейкоцитарного вала и умеренный отек межтучной ткани (рис. 2, в, г). Для определения морфофункциональных характеристик зона первичного термического повреждения и область некроза условно объединены в одну зону. Линейные размеры очагов и размеры всех их зон увеличивались по сравнению с предыдущим сроком исследования (табл. 1).

Количество тучных клеток в разных зонах очагов лазерной деструкции печени и почки через 1 сут после лазерного воздействия увеличивалось по сравнению с предыдущим сроком исследования за счет увеличения

количества как дегранулированных, так и целых форм клеток (табл. 2–4). В случае резекции селезенки такой тенденции не наблюдалось. Индекс дегрануляции тучных клеток в течение суток существенно не изменялся, оставаясь по-прежнему высоким по сравнению с индексом дегрануляции тучных клеток интактной паренхимы (табл. 5).

Обсуждение

Микроскопическое изучение области лазерного воздействия выявило ряд одинаковых морфологических и морфометрических характеристик, что мы связываем с выбором для исследования паренхиматозных органов, характеризующихся наличием множества монотонно повторяющихся структурно-функциональных единиц (печень, почки и селезенка). Почки относятся к зональным паренхиматозным органам, поэтому очаги лазерной деструкции были выполнены в пределах только коркового слоя. Это позволило пренебречь оптическими различиями между корковым и мозговым слоями и изменения оценивались в пределах оптически однородной ткани. Независимо от органа очаги лазерной деструкции имели чащеобразную форму и зональное строение, что согласуется с результатами других исследований [2, 5–7]. Суммарная ширина очага и ширина составляющих его зон во всех исследуемых органах увеличивались в размере (в течение 1 сут) и значения их были сопоставимы.

При изучении популяции тучных клеток в изучаемых органах отклик на лазерное воздействие не был однотипным. Известно, что в ранней фазе регенерации тканей в ответ на лазерное повреждение значимую роль играют тучные клетки, затем эта роль переходит к мононуклеарным фагоцитам, являющимся регуляторами межклеточных взаимодействий [3, 4]. Тучные клетки обладают способностью практически мгновенно реагировать на термическое действие лазерного излучения резким усилением дегрануляции и увеличением их количества. Прямо или опосредованно тучные клетки могут оказывать заметное стимулирующее влияние на репаративные процессы. Доказано, что тучные клетки являются источником основного фактора роста фибробластов и фактора роста сосудистого эндотелия [8]. Повышение концентрации биологически активных веществ создает условия для быстрой репарации тканей в зоне лазерного повреждения [3, 4].

Разные «сценарии» развития репарации тканей в зависимости от того, какой орган поврежден, объясняют результаты нашего исследования. При анализе реакции тучных клеток паренхиматозных органов мы выявили разницу в их реакции на лазерное повреждение. В области деструкции печени и почки наблюдалось усиление

функциональной активности тучных клеток, которая проявлялась увеличением их количества и усилением дегрануляции. В случае резекции селезенки такого эффекта мы не наблюдали. Поскольку в этом органе сосредоточены клетки лимфоцитарного ряда, ведущую роль в ранних процессах репарации тканей там играют, скорее всего, лимфоциты, а тучные клетки активно не привлекаются в этот процесс. Особую роль лимфоцитов в восстановительных процессах в паренхиматозных органах выявили и подтвердили в своих исследованиях А.Г. Бабаева с соавторами [1].

Заключение

Морфометрическая однотипность лазерных повреждений исследуемых тканей позволяет рекомендовать применение одинаковых режимов лазерного излучения при разработке оперативных вмешательств на паренхиматозных органах. Высокая функциональная активность тучных клеток наблюдается в очаге лазерной деструкции печени и почки. В восстановлении тканей селезенки тучные клетки ведущей роли не играют.

Литература

1. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Зотиков Е.А. Роль лимфоцитов в оперативном изменении программы развития тканей. М.: Изд-во РАМН, 2009. 108 с.
2. Вельшер Л.З., Стаханов М.Л., Горчак Ю.Ю. и др. Морфологические особенности течения раневого процесса в тканях почки после лазерного и традиционного рассечения // Лазерная медицина. 2013. Т. 17. № 3. С. 34–40.
3. Головнева Е.С. Патологические механизмы неоангиогенеза, индуцированного воздействием высокоинтенсивного лазерного излучения на ткани (экспер. исслед.): Автореферат дисс. ... докт. мед. наук. Челябинск, 2003. 38 с.
4. Елисеев В.И., Скобелкин О.К., Титова Т.М. Морфология репаративных процессов после остановки желудочных кровотечений с помощью различных лазеров // Архив патологии. 1981. № 9. С. 43–49.
5. Литвин Г.Д. Принципы применения лазеров, лазерных аппаратов и инструментов в хирургии паренхиматозных органов // Актуальные вопросы лазерной хирургии: Мат. Всесоюз. конф. М., 1982. С. 91–95.
6. Сафаров Р.М., Кудрявцев Ю.В. Характеристика воздействия высокоэнергетических лазеров на ткань почки (экспериментальное исследование) // Урология и нефрология. 1996. № 6. С. 14–16.
7. Гужина А.О. и др. Экспериментальное обоснование применения диодного лазера при операциях на селезенке // Лазерные технологии в медицине. Вып. 2. Челябинск, 1999. С. 129–135.
8. Golovneva E.S. Expression of basic fibroblast growth factor in the course of neoangiogenesis stimulated by high-intensity laser irradiation // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2002. Т. 134. № 1. С. 95–97.

Поступила в редакцию 19.07.2015 г.

Для контактов: Астахова Людмила Витальевна
Тел. 8 (351) 749-97-46