

© К. Г. Кемоклидзе, 2019
УДК 611.452:615.849.19:599.323.4

К. Г. Кемоклидзе

КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА ОТВЕТА МОЗГОВОГО ВЕЩЕСТВА НАДПОЧЕЧНИКА НА ЧАСТИЧНОЕ РАЗРУШЕНИЕ ЛАЗЕРОМ ПАРНОГО ОРГАНА МЕТОДОМ ЕСТЕСТВЕННОЙ ПЕРИОДИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. А. В. Павлов), ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава РФ

Цель — комплексная оценка морфологических изменений мозгового вещества надпочечника (МВН) после частичного разрушения лазером парного органа на основе расчётов коэффициентов вариации и выявления естественных периодов.

Материал и методы. На срезах надпочечников взрослых крыс ($n=41$) с различающей окраской адреналокитов и норадреналокитов проведена морфометрия 19 показателей МВН в течение 2 мес после повреждения хирургическим лазером парного органа. Данные обработали методом естественной периодизации.

Результаты. По степени разброса значений показателей в каждый срок от их средних величин за весь период наблюдения и от контроля рассчитаны коэффициенты вариации C_v и C_{vc} . Их динамика позволила выявить естественные периоды: I — усиленного ответа (1–14 сут) с фазой I.1 — быстрой, но более слабой реакции (1–7 сут) и фазой I.2 — медленной, но более сильной реакции (7–14 сут); и II — нормализации (14–56 сут). Прохождение кривых C_{vc} и C_v через точку 21 сут практически по прямой говорит о возможности оптимизировать сходные эксперименты за ее счет. Сближение всех показателей с контролем на 56-е сутки свидетельствует о нецелесообразности продления эксперимента дольше этого срока.

Выводы. Переломной точкой системной реакция МВН, как парной структуры, на лазерное повреждение являются 14-е сутки. При планировании аналогичных экспериментов возможна их оптимизация за счет 21-х суток. Продление аналогичных экспериментов дольше 2 мес нецелесообразно.

Ключевые слова: мозговое вещество надпочечника, естественная периодизация биологических процессов, коэффициент вариации, лазерное повреждение, системная и компенсаторно-приспособительная реакции

Введение. В основе успешного развития биомедицинских оптических технологий, которые все более активно входят в медицинскую практику, особенно в хирургию, лежат фундаментальные исследования реакции биологических тканей на воздействие лазером [2]. В то же время, изменение тканей и органов в ответ на повреждающее воздействие лазером остается малоизученным [10]. В том числе это справедливо для надпочечника и его мозгового вещества — важного звена симпатико-адреналовой системы.

В случае повреждения лазером одного из надпочечников в паре дополнительный теоретический и практический интерес представляет изучение ответа противоположного неповрежденного органа.

Одним из эффективных способов изучения ответной реакции биологических структур на повреждение является их разносторонняя морфометрия в динамике, однако получаемые при этом наборы разнородных показателей трудно соотнести между собой. Облегчить эту задачу помогает метод естественной периодизации биологических процессов [4] в сочетании с его вари-

антом, адаптированным для экспериментальных работ [5].

В настоящем исследовании оба варианта метода применены к 2-месячной динамике морфологических показателей неповрежденного мозгового вещества надпочечника после повреждения хирургическим лазером контралатерального органа с целью комплексной оценки морфологических изменений мозгового вещества после данного варианта воздействия.

Материал и методы. Исследование проведено на крысах-самцах породы Вистар с массой тела 372 ± 40 г, у 36 из них после наркоза хлороформом осуществлено точечное воздействие хирургическим лазером на левый надпочечник с аблацией части органа, включая мозговое вещество, 5 животных оставлены интактными для контроля. Для воздействия использован диодный хирургический лазер «Лами» (Опттехника, Россия) со стандартными для паренхиматозных органов настройками: длина волны — 1020 нм, мощность излучения — 2,5 Вт, диаметр световода — 400 мкм, 150 импульсов по 190 мс с промежутком в 10 мс (энергия воздействия — 71,25 Дж). Объем удаленных в результате аблации тканей составил $0,30 \pm 0,10$ мм³ при объеме органа $10,0 \pm 2,5$ мм³. В 1-, 7-, 14-, 21-, 28-е и 56-е сутки, используя пары эфира, животных выводили из эксперимента по 5–7

Сведения об авторе:

Кемоклидзе Константин Гербертович (e-mail: K_G_K@mail.ru), кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5

на каждый срок и забирали неповрежденные надпочечники. Обращение с животными соответствовало действующим «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 г.), Хельсинкской декларации 1975 г., включая её пересмотренный вариант 2000 г., и Директиве 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета от 22.09.2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

Для выявления в мозговом веществе надпочечника двух основных субпопуляций хромаффинных клеток — адреналокситов и норадреналокситов использовали метод Нопге [9], для этого надпочечники фиксировали в глутаровом альдегиде, а приготовленные с парафиновых заливок срезы выдерживали в бихромате калия и окрашивали толуидиновым синим. После обработки адреналокситы становились голубыми, а норадреналокситы — зелеными.

Для морфометрии применяли метод стереологии [3] и метод «полей» [1]. На выбранных случайным образом срезах надпочечника на мозговое вещество проецировали окулярную сетку из 60 равноудалённых точек (об. 40, ок. 7, бинокулярная насадка ув. 1,5). По соотношению (проценту) точек с 20 полей, попавших на хромаффиноциты (совместно и отдельно по субпопуляциям), соединительнотканную строму, кровеносные сосуды и нейроны, определяли их относительные доли в мозговом веществе. Согласно основным принципам стереологии, полученные значения относительных долей тканевых компонентов равнозначны их относительным объёмам (объёмным долям) в мозговом веществе.

Также на цифровых изображениях срезов (об. 40), выбранных случайным образом, в программе ImageJ обводили периметры адреналокситов и норадреналокситов и рассчитывали их размеры (площади сечения). Таким же способом были определены площади ядер каждой субпопуляции хромаффиноцитов и такие параметры их формы, как округлость, выпуклость и вытянутость. Всего изучены 19 показателей.

Метод естественной периодизации биологических процессов применен в его оригинальном [4] и адаптированном для экспериментальных исследований вариантах [5]. В первом случае определяли сколько процентов составляет в данный срок каждый показатель от его средней величины за весь период эксперимента, во втором случае — от контроля. Соответственно для каждого срока рассчитывали 2 варианта коэффициентов вариации: C_v , отражающий степень отклонения показателей от их средних величин за весь период эксперимента, и C_{vc} , отражающий степень отклонения показателей от контроля. По величине и динамике C_v и C_{vc} оценивали совокупный морфологический ответ мозгового вещества надпочечника и выявляли в нём рамки естественных периодов.

Результаты исследования. Выстроенные кривые всех изученных показателей центрированы относительно прямых (100 % по оси ординат) линий, соответствующих контролю и средним величинам за весь период эксперимента. Полученные графики совмещены с графиками кривых C_{vc} и C_v , характер которых отражает степень разброса показателей в тот или иной срок относительно центрирующих линий контроля или средней по всему эксперименту (рисунки).

C_{vc} за весь период эксперимента колеблется в пределах 4–22 %. При этом кривая C_{vc} ,

резко меняя направление, делится на 2 отрезка: 1–14 и 14–56 сут (см. рисунок, в, г).

В 1-е сутки кривые показателей имеют наименьшее отклонение от центрирующей линии, и C_{vc} составляет минимальную за весь срок наблюдения величину в 4,1 %, затем разброс кривых начинает расти. C_{vc} к 14-м суткам составляет 21,6 % — максимум за весь период эксперимента.

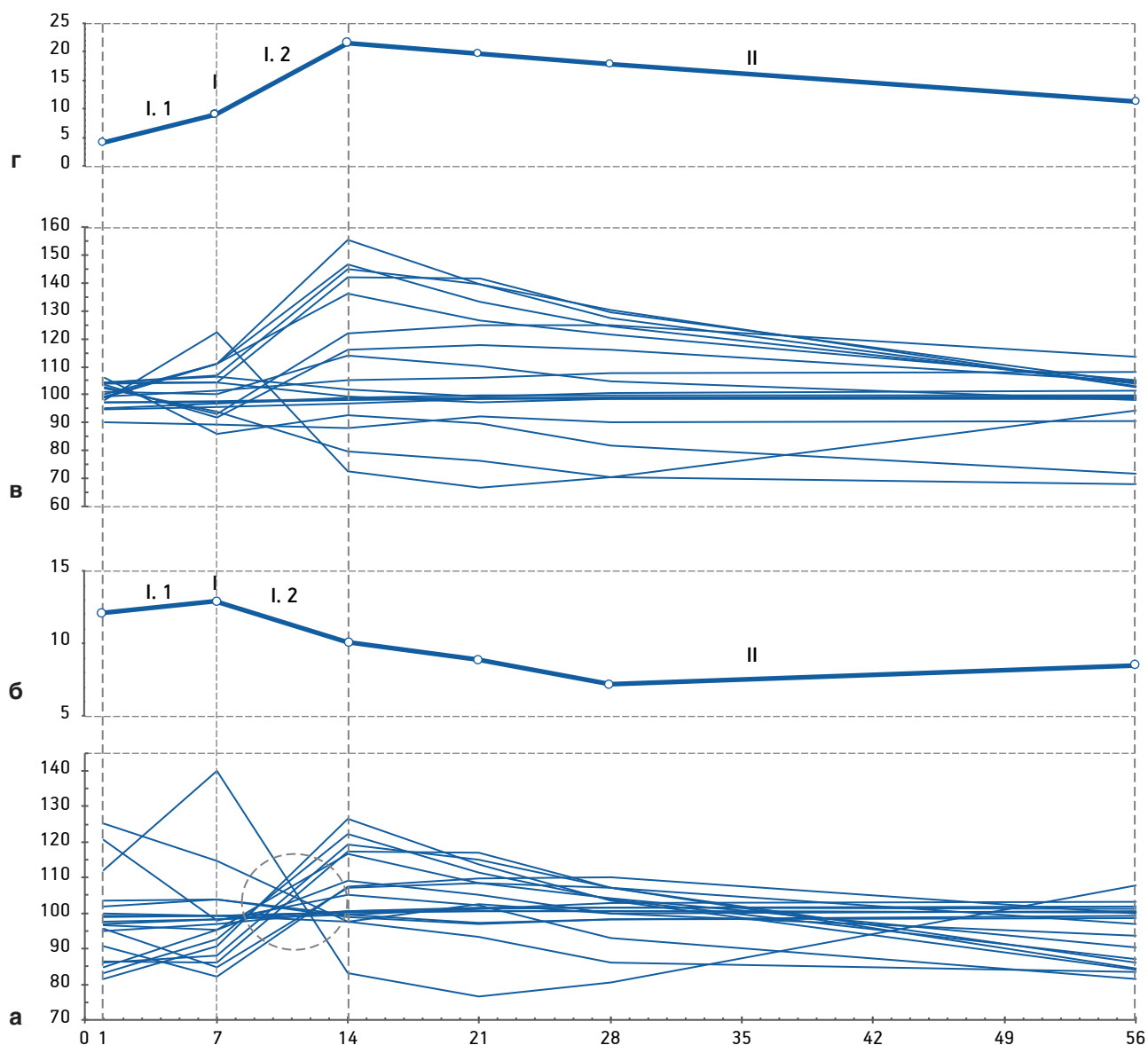
С 14-х суток разброс кривых начинает плавно уменьшаться. Соответственно C_{vc} плавно снижается до конца периода, достигая на 56-е сутки 11,4 %, т. е. вдвое меньше, чем на 14-е сутки.

C_v в течение всего эксперимента колеблется в пределах 7–13 %. С 1-х по 7-е сутки он имеет слабо выраженную тенденцию к росту с 12,1 до 12,9 %, затем с 7-х суток он плавно снижается до 7,2–8,5 % на 28-е и 56-е сутки соответственно. В результате кривая C_v не имеет резких перегибов, отчетливо разбивающих ее на периоды. Однако совокупность кривых отдельных показателей, складывающихся в характерный рисунок, дополняет общую картину. Между 7-ми и 14-ми сутками кривые большинства отдельных показателей образуют характерную компактную область перекрещивания — «узловую точку». С учетом смены вектора изменений C_v и наличия узловой точки кривая этого коэффициента также разбивается на 2 отрезка: 1–14 и 14–56 сут (см. рисунок, а, б).

Вариабельность считается слабой при коэффициенте вариации меньше 10 %, средней — в диапазоне 10–20 % (по некоторым источникам — 10–25 %) и сильной, если коэффициент вариации больше 20 % (по некоторым источникам, если больше 25 %) [7, 8]. Соответственно C_{vc} , связанный с контролем, показывает пятикратные различия в наименьшей и наибольшей точках от очень слабой вариабельности в начале наблюдения (1-е сутки) до сильной (или верхней границы средней) величины (14-е сутки). После 14-х суток коэффициент C_{vc} плавно снижается, вплотную приближаясь, но не выходя за границу в 10 %, т. е. средней вариабельности.

C_v показывает лишь менее чем двукратное различие между максимумом и минимумом (7,2–12,1). При этом значения этого коэффициента характеризуются средней вариабельностью, граничащей со слабой до 14-х суток, и низкой вариабельностью, граничащей со средней с 14-х суток до конца наблюдения.

Обсуждение полученных данных. Наиболее показательной оказалась траектория кривой C_{vc} . До 14-х суток она демонстрирует подъём, затем на отрезке 14–56 сут идёт на спад, принимая при этом вид фактически прямой линии,



Кривые 2-месячной динамики 19 морфологических показателей мозгового вещества надпочечника крысы после частичного разрушения хирургическим лазером контралатерального органа, соотнесённые с их средними величинами за весь период эксперимента (а) и контролем (в).

Над комплексами кривых показателей помещены кривые коэффициентов вариации C_v (б) и C_{vc} (г), отражающие степень разброса показателей. По оси абсцисс — срок (сут); по оси ординат — относительные величины морфометрических показателей (%) и коэффициентов C_v и C_{vc} . Вертикальный толстый пунктир — рамки выявленных естественных периодов: I — усиленного системного ответа, II — нормализации; вертикальный тонкий пунктир — деление фаз I периода: I. 1 — быстрой, но слабой реакции; I. 2 — медленной, но сильной реакции; пунктирная окружность — «узловая точка»

хотя и проходит через 4 временные точки. Таким образом, по C_{vc} , отражающим степень отклонения показателей от их контрольных величин, именно 14-е сутки являются пиковой точкой ответа неповреждённого мозгового вещества надпочечника на лазерное повреждение контралатерального органа. Для сравнения в серии ранее опубликованных автором с коллегами работ было показано, что в органе, неповрежденном лазером, именно на 14-е сутки приходится наиболее ярко выраженный компенсаторно-приспособительный

ответ в виде гипертрофии хромаффиноцитов. При этом в поврежденном органе, вплоть до 7-х суток, в части мозгового вещества, оказавшейся вне зоны поражения и выжившей, продолжается гибель хромаффиноцитов, и деструктивные процессы преобладают над восстановительными. С 7-х по 14-е сутки острота воспаления снижается, гибель эндокриноцитов прекращается, и положение стабилизируется, а с 14-х суток восстановительные процессы начинают преобладать над деструктивными. В эту временную точку

устанавливается равновесие между деструктивными и восстановительными процессами, а пик регенеративных изменений приходится на конец 1-го месяца.

Факт, что в мозговом веществе неповреждённого надпочечника пик ответа приходится на 14-е сутки, а на 7-е сутки реакция не столь заметна, в то время как в повреждённом парном органе всю 1-ю неделю преобладает деструкция с пиком на 7-е сутки, можно связать с тем, что развивающиеся в поврежденном органе процессы являются прямым ответом на воздействие, в то время как в неповрежденном парном органе этот ответ — опосредованный. По мере снижения сигналов о неблагополучии в поврежденном органе показатели в неповрежденном мозговом веществе плавно нормализуются. При этом, хотя привязанный к контролю коэффициент вариации C_{vc} после пиковых значений на 14-е сутки (21,6) далее снижается очень отчетливо, он и через 2 мес после воздействия остается более чем вдвое выше, чем в 1-е сутки (11,4 против 4,1). Это объясняется тем, что выжившее после лазерной деструкции мозговое вещество контралатерального надпочечника обладает слабой регенеративной способностью, не восстанавливается до исходного объема [6] и, следовательно, сигналы, стимулирующие системный ответ в неповрежденном мозговом веществе, на позднем сроке, хотя и ослабевают, но не прекращаются.

C_v , отражающий степень отклонения показателей от их средних величин, несколько выше на 7-е сутки, чем на 14-е, однако можно обнаружить, что за исключением кривой относительной доли сосудов разброс остальных кривых выше именно на 14-е сутки, соответственно, и C_v без учета сосудов на 14-е сутки выше, чем в другие временные точки. С такой корректировкой данные по C_v , так же как и по C_{vc} , делают именно 14-е сутки кризисной (переломной) точкой системного ответа на данный тип повреждения. Ситуация с показателем сосудов, выбивающимся из общего ряда, совершенно логична, так как доля сосудов в мозговом веществе надпочечника, в отличие от других показателей, может измениться практически мгновенно в результате притока или оттока крови, при том, что мозговое вещество надпочечника характеризуется наличием объемистых тонкостенных синусоидов.

Таким образом, обобщенно по обоим коэффициентам вариации интервал с 1-х по 14-е сутки можно обозначить как период I — усиленного системного ответа, в котором выделяются фаза I.1 — быстрой, но более слабой реакции (1–7-е сутки) и I.2 — фаза медленной,

но более сильной реакции (7–14-е сутки). В период с 14-х по 56-е сутки почти все исследованные показатели двигаются к нормализации с плавным снижением коэффициентов вариации и относительно контроля, и относительно средних величин. Этот интервал можно обозначить как период II — нормализации. Выявленная естественная периодизация в неповрежденном мозговом веществе имеет как сходство, так и отличие от таковой в поврежденном парном органе, в котором выявляются: период I — преобладание деструктивных изменений, период II — усиленное восстановление, фаза II.1 — стабилизация, фаза II.2 — преобладание восстановительных процессов и период III — нормализация [5]. Наибольшее отличие выявляется на начальных этапах, наименьшее — на конечных.

Кроме возможности анализировать данные по всей совокупности разнородных показателей, метод естественной периодизации даёт возможность оптимизации при планировании аналогичных исследований. Кривые C_{vc} и C_v через точку 21-е сутки проходят практически по прямой, что говорит о возможности оптимизации эксперимента именно за счет этого срока. Кроме того, отчетливое сближение показателей к концу 2-го месяца наблюдения с контрольными значениями свидетельствует о нецелесообразности и нерациональности продления эксперимента дольше этого срока. Эта информация тем более ценна, что и для поврежденного контралатерального органа оптимизация возможна именно за счет этой же точки 21-е сутки и ограничения срока эксперимента 56-и сутками [5]. Через точку 28-е сутки кривая C_{vc} проходит по прямой, а C_v — со слабым отклонением, но эта точка очень важна для поврежденного контралатерального органа, поэтому для изучения системного ответа проводить оптимизацию за счет этого срока некорректно. Кризисный характер точки 14-е сутки, выявляемый обоими коэффициентами как для поврежденного органа, так и парного неповрежденного, требует к ней особого внимания и обязательного включения её в эксперимент при планировании аналогичных исследований.

Заключение. Таким образом, кризисной точкой системной реакции мозгового вещества надпочечника на лазерное повреждение, как связанной парной структуры, являются 14-е сутки. При планировании аналогичных экспериментов возможна их оптимизация за счет точки 21-е сутки. Продление аналогичных экспериментов дольше 2 мес нецелесообразно.

Автор сообщает об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г., Яблучанский Н.И., Губенко В.Г. Системная стереометрия в изучении патологического процесса. М.: Медицина, 1981 [Avtandilov G.G., Yabluchanskiy N.I., Gubenko V.G. Systemic stereometry in the study of the pathological process. M.: Meditsina, 1981. In Russ.].
2. Гейниц А.В., Цыганова В.И. Лазерные технологии в медицине: настоящее и будущее // Лазерная медицина. 2014. Т. 18, вып. 4. С. 11–12 [Geynits A.V., Tsyganova V.I. Laser technologies in medicine: the present and the future // Lazernaya meditsina. 2014. Vol. 18, № 4. P. 11–12. In Russ.].
3. Гуцол А.А., Кондратьев Б.Ю. Практическая морфометрия органов и тканей. Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1988 [Gutsol A.A., Kondrat'ev B.Yu. Practical morphometry of organs and tissues. Tomsk: Izdatel'stvo Tomskogo universiteta, 1988. In Russ.].
4. Катинас Г.С., Быков В.Л. Метод естественной периодизации процессов // Арх. анат. 1976. Т. 71, вып. 9. С. 98–103 [Katinas G.S., Bykov V.L. The method of natural periodization of processes // Arhiv anatomii. 1976. Vol. 71, № 9. P. 98–103. In Russ.].
5. Кемоклидзе К.Г. Модификация метода естественной периодизации биологических процессов // Морфология. 2016. Т. 150, вып. 4. С. 80–83 [Kemoklidze K.G. The modification of the method of natural periodization of biological processes // Morfologiya. 2016. Vol. 150, № 4. P. 80–83. In Russ.].
6. 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 [Kemoklidze K.G., Tiumina N.A. The dynamics of quantitative parameters of rat adrenal medulla after its partial laser destruction // Morfologiya. 2014. Vol. 146, № 6. P. 63–67. In Russ.].
7. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990 [Lakin G.F. Biometriya. M.: Vysshaya shkola, 1990. In Russ.].
8. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012 [Truhacheva N.V. Mathematical statistics in biomedical research using the Statistica package. M.: GEOTAR-Media, 2012. In Russ.].
9. 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. 1971. Vol. 19, № 8. P. 483–486.
10. Welch A.J., van Gemert M.J.C. Overview of optical and thermal laser-tissue interaction and nomenclature. In book: Optical-thermal response of laser-irradiated tissue. Dordrecht [etc.]: Springer, 2011. Ch. 1. P. 3–11.

Поступила в редакцию 11.04.2019

Получена после доработки 08.07.2019

COMPLEX ASSESSMENT OF THE ADRENAL MEDULLA RESPONSE TO PARTIAL LASER DESTRUCTION OF A PAIRED ORGAN USING THE METHOD OF NATURAL PERIODIZATION OF BIOLOGICAL PROCESSES

K. G. Kemoklidze

Objective — complex assessment of morphological changes in the adrenal medulla (AM) after partial laser destruction of a paired organ, based on the calculation of variation coefficients and the identification of natural periods

Material and methods. On sections of the adrenal glands of adult rats (n=41), with a differentiating staining of adrenolocytes and noradrenolocytes, morphometry of 19 AM parameters was performed during 2 months after a surgical laser injury to the paired organ. The data were processed according to the natural periodization method.

Results. According to the degree of variation of the parameters in each time point from their average values for the entire observation period and from control we calculated the coefficients of variation Cv and Cvc. Their dynamics allowed us to reveal the natural periods: I period — enhanced response (1–14 days) with phases I.1 — a quick, but weaker reaction (days 1–7) and I.2 — a slow, but stronger reaction (7–14 days); and II period — normalization (days 14–56).

Passing the curves of Cvc and Cv through the time point of the 21st day almost in a straight-line indicates a possibility of optimizing similar experiments taking into account this time point. The convergence of all parameters with the control on the 56th day shows that it is impractical to prolong the experiment.

Conclusions. 1) The crucial point of the systemic reaction of AM as a paired structure to laser damage is the 14th day. 2) When planning similar experiments, it is possible to optimize them taking into account the 21st day. 3) Extension of similar experiments longer than 2 months is not rational.

Key words: adrenal medulla, natural periodization of biological processes, coefficient of variation, laser damage, systemic and compensatory-adaptive reactions

Department of Histology, Cytology and Embryology, Yaroslavl' State Medical University, 5 Revolutsionnaya St., Yaroslavl' 150000