

© К. Г. Кемоклидзе, Н. А. Тюмина Н. А., 2014
УДК 612.014.48:611.452:599.323.4

К. Г. Кемоклидзе и Н. А. Тюмина

ДИНАМИКА КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МОЗГОВОГО ВЕЩЕСТВА НАДПОЧЕЧНИКА КРЫСЫ ПОСЛЕ ЧАСТИЧНОЙ ЛАЗЕРНОЙ ДЕСТРУКЦИИ

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. А. В. Павлов), Ярославская государственная медицинская академия

Морфометрическими методами исследована динамика количественных показателей выжившей после лазерного повреждения части мозгового вещества надпочечника (МВН) у крыс линии Вистар ($n=41$) в течение 2 мес. На парафиновых срезах, окрашенных по методу Л. Н. Нопге, изучены объемные доли в МВН и средние площади сечения адреналокитов и норадреналокитов, доли кровеносных сосудов, стромы и нейронов. Относительные объемы кровеносных сосудов достигают максимальных значений на 7-е сутки, а хромоаффинокитов — на 28-е сутки эксперимента. Объемные доли стромы и нейронов в ходе опыта значительно не изменяются. По оригинальной методике рассчитаны реальные убыль и прирост объема железистой паренхимы выжившей части МВН. Реальная убыль хромоаффинокитов достигает максимума в 1,5% на 7-е сутки, а максимум их реального прироста в 4,7% наблюдается на 28-е сутки (скорость прироста составляет 1–2,5% в неделю). До 28-х суток в восстановительных процессах преобладает гиперплазия хромоаффинокитов, на 28-е сутки существенный вклад вносит гипертрофия. К 56-м суткам зона выживания МВН нормализуется.

Ключевые слова: надпочечник, мозговое вещество, хромоаффинокитная ткань, лазерное повреждение, морфометрия

Лазерная хирургия, ставшая одним из значительных достижений современной медицины, применяется с каждым годом всё более активно. Между тем, реакция тканей и органов на лазерное повреждение (ЛП) всё ещё остаётся недостаточно изученной [14]. Сказанное в полной мере относится к надпочечнику, лазерная хирургия которого имеет уже более чем двадцатипятилетнюю историю [2] и успешно применяется в настоящее время [13]. Фундаментальным исследованиям гистологических характеристик состояния надпочечника после ЛП посвящена серия публикаций, однако полученные данные неполны [4, 6, 7]. Показано, что ЛП вызывает коагуляционный некроз, приводящий к распаду паренхимы и замещение её рубцовой тканью. При этом, если хотя бы $\frac{1}{3}$ паренхимы оказывается вне зоны поражения, то она не только выживает, но и, отграничиваясь от повреждённой части, постепенно принимает нормальный вид. Объективная оценка выраженности деструктивных и регенеративных процессов в выжившей части надпочечника представляет не только теоретический, но и практический интерес и может быть проведена с использованием морфометрического метода раздельно для коркового и мозгового вещества надпочечника (МВН).

Данная работа посвящена экспериментальному изучению динамики количественных показателей части МВН, выжившей после ЛП.

Материал и методы. Исследование выполнено на 41 крысе-самце линии Вистар массой 372 ± 40 г, из которых у 36 под хлороформным наркозом проведена лазерная деструкция части левого надпочечника; 5 интактных крыс служили контролем. Для ЛП применён диодный хирургический лазерный аппарат «Лами» (Опттехника, Россия) со стандартными для паренхиматозных органов параметрами: длина волны 1020 нм, мощность излучения 2,5 Вт, световод диаметром 400 мкм, 150 импульсов по 190 мс с интервалом в 10 мс (энергия воздействия 71,25 Дж). Объём испарённой ткани составил $0,30\pm 0,10$ мм³ при объёме надпочечника в момент повреждения $10,0\pm 2,5$ мм³. На 1-, 7-, 14-, 21-, 28-е и 56-е сутки парами эфира производили эвтаназию по 5–7 животных на временную точку и взятие надпочечников. Обращение с животными соответствовало «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 г.).

Для дифференцировки в МВН двух основных субпопуляций хромоаффинокитов — адреналокитов и норадреналокитов применяли метод Л. Н. Нопге [9], согласно которому материал фиксировали в глутаральдегиде, заливали в парафин, а срезы окрашивали бихроматом калия — толуидиновым синим. В результате норадреналокиты приобретали зелёный, а адреналокиты — серовато-фиолетовый цвет.

Морфометрию проводили стереологическим методом [3] с учетом подходов, разработанных при оценке механизмов постнатального роста хромоаффинокитной ткани надпочечника [8]. В выжившей части МВН — органов, сохранивших после ЛП, не менее $\frac{1}{3}$ паренхимы, стереологическим методом «полей» [1] на случайных срезах были определены относительные объемы (объемные доли) адреналокитов и норадреналокитов (вместе и раздельно), кровеносных сосудов, соединительнотканной стромы и нейронов (об. 40, ок. 7, бинокулярная насадка 1,5, окулярная вставка с 60 равноуда-

Сведения об авторах:

Кемоклидзе Константин Гербертович (e-mail: K_G_K@mail.ru), Тюмина Наталья Андреевна (e-mail: Natellamail@mail.ru), кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, Ярославская государственная медицинская академия, 150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5

ленными точками). Средние площади сечения адреналочитов и норадреналочитов определяли путём обведения периметров клеток в программе ImageJ (дистрибутив Fiji, открытое ПО) на цифровых фотографиях случайных срезов (об.40, ок.10). Статистическую обработку проводили с помощью программ УГС 2.0 [5] и Microsoft Excel. Различия измеряемых структур оценивали по t-критерию Стьюдента и считали значимыми при $P < 0,05$.

Результаты исследования. Анализ динамики соотношения основных тканевых компонентов МВН после ЛП (рис. 1, а) показал,

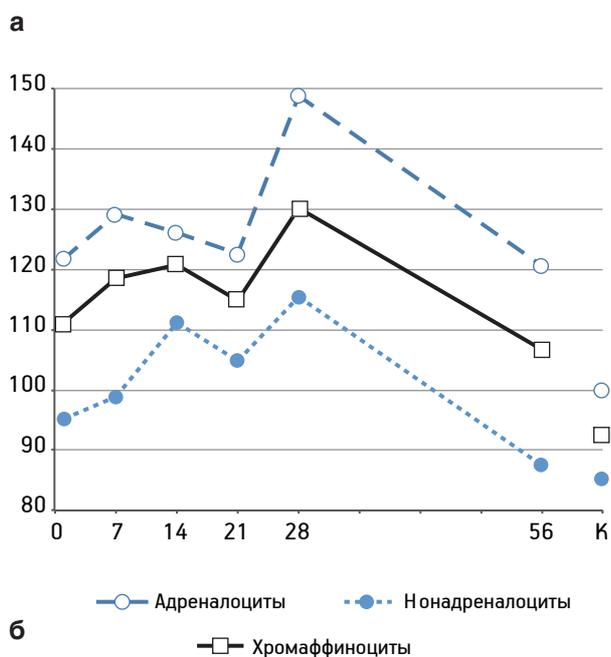
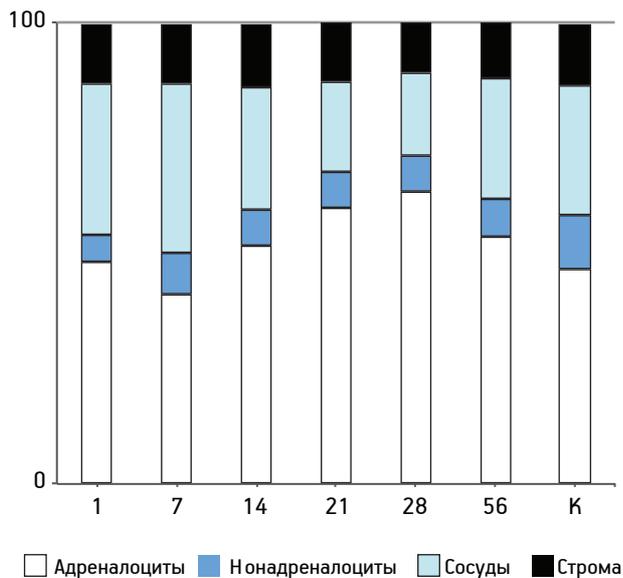


Рис. 1. Динамика соотношения основных тканевых компонентов (а) и средней площади сечения хромаффиноцитов (б) в мозговом веществе надпочечника у крысы после его лазерного повреждения.

По оси абсцисс — срок после воздействия (сут), К — контроль; по оси ординат: а — доля тканевых компонентов (%); б — средняя площадь сечения хромаффиноцитов в целом и их субпопуляций (мкм²)

что относительный объем кровеносных сосудов на 7-е сутки достигает максимального значения ($37 \pm 5\%$; $P < 0,01$ по сравнению с контролем), затем плавно снижается ($P < 0,01$ по сравнению с 7-ми сутками и контролем) до минимума ($18,0 \pm 0,7\%$) на 28-е сутки. К 56-м суткам данный показатель нормализуется ($26,0 \pm 2,1\%$, $P > 0,05$ по сравнению с контролем).

Объемные доли хромаффиноцитов в целом и отдельно субпопуляции адреналочитов на 1-е сутки — $54 \pm 4\%$ и $48 \pm 3\%$ значимо не отличаются от контрольных значений — 58 ± 5 и $46 \pm 3\%$ соответственно ($P > 0,05$). К 7-м суткам величины этих показателей снижаются до 50 ± 4 и $41 \pm 3\%$ ($P < 0,05$ по сравнению с контролем и на 1-е сутки), а на 28-е сутки — достигают максимальных значений — $71,2 \pm 1,5$ и $63,4 \pm 1,9\%$ ($P < 0,01$ по сравнению с таковыми на 7-е сутки и с контролем).

Относительный объем субпопуляции норадреналочитов через 1 сут после ЛП снижается до $5,7 \pm 0,9\%$ ($P < 0,01$ по сравнению с контролем; $11,9 \pm 2,1\%$), к 7-м суткам данный показатель увеличивается до $8,8 \pm 1,6\%$ и остаётся неизменным до конца наблюдения, не достигая при этом уровня контроля ($P < 0,05$).

Доля стромы, составлявшая в начале наблюдения $12,9 \pm 2,2\%$, значимо не меняется в течение всего изученного 2-месячного периода и не отличается от контроля ($13 \pm 4\%$; $P > 0,05$). Значимых изменений относительных объемов нейронов по сравнению с контрольными значениями в эксперименте также не зарегистрировано ($P > 0,05$).

Показательна динамика соотношения объемных фракций «хромаффиноциты/строма» (рис. 2, а, б). На 1-е сутки оно не отличается от контроля (4,2 и 4,3 соответственно), затем плавно увеличивается, достигая на 28-е сутки максимального значения (6,6); к 56-м суткам этот показатель снижается (5,1), но так и не нормализуется.

Необходимо учесть, что рост или уменьшение доли одного компонента автоматически уменьшает или увеличивает доли других, даже если реальных изменений они не претерпевают. Однако если бы после ЛП в выжившей части МВН реально менялся только объем кровеносных сосудов, то соотношение «хромаффиноциты/строма» (очень малой долей нейронов можно пренебречь) должно было бы оставаться стабильным на протяжении всего эксперимента. Таким образом, изменение соотношения «хромаффиноциты/строма» в пользу стромы означает, что уменьшение доли хромаффиноцитов не пропорционально ответу на увеличение доли сосудов и вскрывает реальную убыль, т. е. гибель и распад хромаффиноцитов за пределами зоны поражения (рис. 3, а, б).

Аналогично изменение соотношения «хромаффиноциты/строма» в пользу эндокринных клеток выявляет реальный прирост хромаффинной ткани, т.е. процесс её восстановительной регенерации за счёт гиперплазии (см. рис. 3, в) и гипертрофии. Из этого следует, что если разницу между долями хромаффиноцитов в данный срок эксперимента и в контроле скорректировать на величину, обусловленную только динамикой доли кровеносных сосудов, то можно оценить реальный масштаб убыли или прироста доли хромаффинной ткани. Долю хромаффиноцитов, обусловленную только динамикой сосудов, можно вычислить, если от разницы между долями сосудов в контроле и в данный срок эксперимента оставить только часть, пропорциональную «эталонному» соотношению «хромаффиноциты/строма» в контроле. Исходя из сказанного, можно составить следующую формулу:

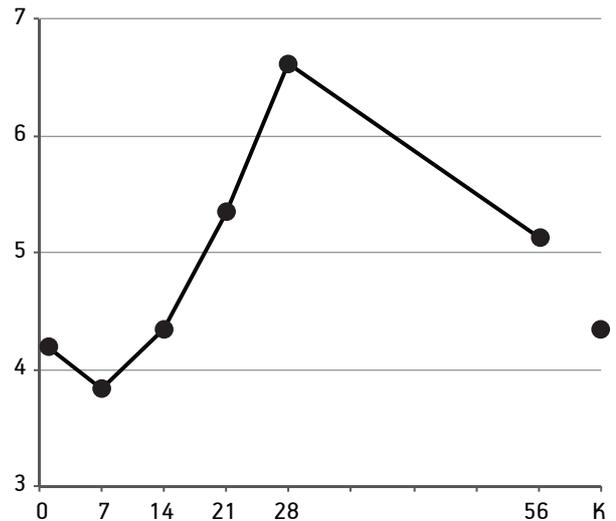
$$Y\phi_{ANi} = (\phi_{ANi} - \phi_{ANctrl}) - (\phi_{Vctrl} - \phi_{Vi}) \times \frac{\phi_{ANctrl}}{(\phi_{ANctrl} + \phi_{Sctrl})}$$

где $Y\phi_{ANi}$ — доля реального прироста (при отрицательном значении — доля реальной убыли) хромаффиноцитов в данный срок эксперимента, ϕ_{ANi} — доля хромаффиноцитов в данный срок эксперимента, ϕ_{ANctrl} — доля хромаффиноцитов в контроле, ϕ_{Vctrl} — доля кровеносных сосудов в контроле, ϕ_{Vi} — доля кровеносных сосудов в данный срок эксперимента, ϕ_{Sctrl} — доля стромы в контроле.

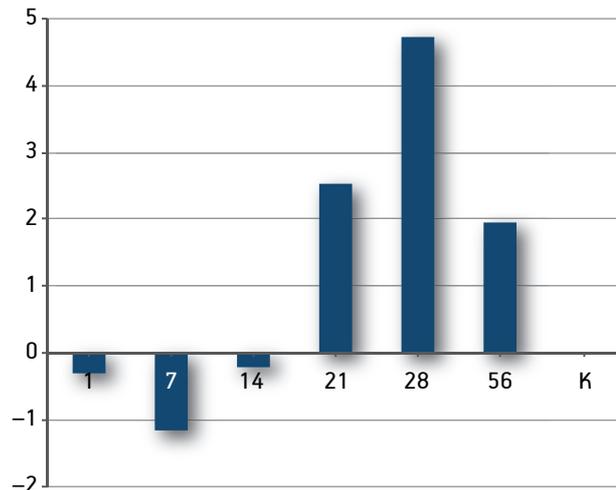
В результате выявляется, что на 1-е сутки реальная убыль хромаффиноцитов составляет 0,3%, а к 7-м суткам достигает уже 1,5%. После 7-х суток убыль сменяется приростом. До 14-х суток скорость прироста — около 1% в неделю, а с 14-х до 28-х суток — 2–2,5% в неделю. К 28-м суткам реальный прирост хромаффиноцитов достигает максимума в 4,7%, затем начинает снижаться и к 56-м суткам составляет уже 2% (см. рис. 2, б).

Средняя площадь сечения хромаффиноцитов (в расчете на всю популяцию) уже через 1 сут после ЛП составляет 111 ± 6 мкм², что на 20% больше, чем в контроле (93 ± 6 мкм², $P < 0,01$). До конца 1-го месяца отмечены 2 пика дальнейшего роста данного показателя на 14-е и 28-е сутки ($120,9 \pm 1,4$ и $130,1 \pm 2,5$ мкм² соответственно; $P < 0,01$). К 56-м суткам происходит уменьшение показателя до 107 ± 4 мкм² (увеличиваясь на 15% по сравнению с контролем, $P < 0,05$).

Средняя площадь сечения адреналочитов возрастает через 1 сут до 122 ± 8 мкм² по сравнению с контролем (100 ± 9 мкм², $P < 0,01$), стабилизируется на этом уровне до 21-х суток ($P > 0,05$ по сравнению с таковой на 1-, 7-е и 14-е сутки) и достигает



а



б

Рис. 2. Динамика соотношения «хромаффиноциты/строма» (а) и рассчитанная доля реальной убыли и прироста объема хромаффинной ткани (б) в мозговом веществе надпочечника у крысы после его лазерного повреждения.

По оси абсцисс — срок после воздействия (сут), К — контроль; по оси ординат: а — соотношение объемных фракций хромаффиноцитов и стромы; б — положительные величины — рассчитанный прирост объема хромаффиноцитов, отрицательные величины — рассчитанная убыль хромаффиноцитов (%)

максимума к 28-м суткам опыта (149 ± 4 мкм², $P < 0,01$ по сравнению с показателем на 21-е сутки). К 56-м суткам размеры адреналочитов снижаются до 120 ± 6 мкм², однако остаются незначимо (на 20%) больше, чем в контроле ($P > 0,05$).

На 1-е сутки превышают уровень контроля (85 ± 7 мкм²) и средние размеры норадреналочитов — (95 ± 6 мкм², $P < 0,01$). К 14-м суткам данный показатель возрастает до 111 ± 6 мкм² (по сравне-

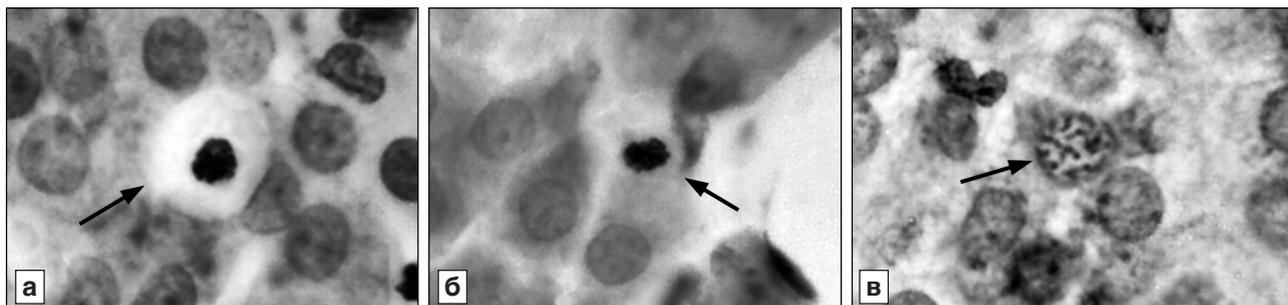


Рис. 3. Зона выживания мозгового вещества надпочечника у крысы через 1 сут (а, б) и 21 сут (в) после его лазерного повреждения.

а — гибнущий адреналокит (стрелка); б — гибнущий норадреналокит (стрелка); в — митоз адреналокита (стрелка). Окраска по Л.Н.Нопге [9]. Об.85, ок.10

нию с таковым на 1-е сутки — $P < 0,01$ и на 7-е сутки — $P < 0,05$). Затем до 21-х суток этот показатель стабилен, составляя $105 \pm 8 \text{ мкм}^2$ ($P > 0,05$ по сравнению с показателем на 14-е сутки), а к 28-м суткам вновь увеличивается, достигая максимума в $115,5 \pm 0,4 \text{ мкм}^2$ ($P < 0,05$ по сравнению с таковым на 21-е сутки). К 56-м суткам (см. рис. 1, б) средние размеры норадреналокитов нормализуются ($87,5 \pm 1,3 \text{ мкм}^2$; $P > 0,05$ по сравнению с контролем).

Соотношение адреналокитов и норадреналокитов во все сроки эксперимента оказалось значительно ниже контрольного: в среднем $87,1 \pm 2,6$ и $12,9 \pm 2,6\%$ — $79,7 \pm 2,2$ и $20,3 \pm 2,2\%$ соответственно ($P < 0,01$). Наиболее существенные различия на 1-е сутки после ЛП: $89,5 \pm 0,9$ и $10,5 \pm 0,9\%$ соответственно ($P < 0,01$ по сравнению с контролем).

Обсуждение полученных данных. Динамика объема каждого тканевого компонента МВН имеет свою специфику. Для хромаффинокитов она, в первую очередь, определяется изменением их количества и размеров, для волокнистой соединительной ткани — состоянием её межклеточного вещества. Динамика объема кровеносных сосудов в краткосрочном периоде тесно связана с изменением их просвета под действием кровяного давления и кровенаполнения, а в отдаленные сроки — и с их новообразованием или разрушением. Следует отметить, что при ЛП важную роль играет величина кровотока через сосудистую сеть органа [12], которая в надпочечнике является одной из самых высоких в организме [11].

Увеличение доли кровеносных сосудов по сравнению с контролем в МВН и динамика этого показателя хорошо соотносятся с данными гистологического описания надпочечника после ЛП [4, 6, 7]. На 7-е сутки, когда доля сосудов достигает максимума, приходится и пик величины надпочечника в целом. Наиболее вероятной причиной роста доли сосудов в МВН в течение 1-й недели после ЛП является увеличение их кровенаполне-

ния вследствие закупорки кровотока лазерным струпом и развивающейся воспалительной реакции. По мере распада лазерного струпа, образования новых сосудов в поврежденной части и снижения остроты воспалительной реакции кровотоки нормализуются, и доля сосудов в неповрежденной части МВН плавно снижается.

Выявленная реальная убыль хромаффинокитов хорошо согласуется с данными гистологического исследования. Согласно им, гибнущие клетки в выжившей после ЛП части МВН встречаются вплоть до конца 1-й недели после воздействия [7]. Уменьшение реального прироста хромаффинокитов после достижения пиковых значений на 28-е сутки, очевидно, связано с торможением пролиферации эндокриноцитов и уменьшением их размеров на фоне роста соединительной ткани, что необходимо для возвращения соотношения «хромаффинокиты/строма» к исходному (контроль) значению, т.е. для нормального функционирования хромаффинной ткани.

Тот факт, что соотношение адреналокитов и норадреналокитов на 1-е сутки эксперимента существенно сдвигается в пользу адреналокитов, а доля хромаффинокитов, в целом, в это время не отличается от контрольной, свидетельствует о том, что ЛП вызывает не избирательную гибель одного из видов клеток, а изменение процессов синтеза и накопления норадреналина и адреналина. Это согласуется с данными гистологического исследования [6], показывающими, что непосредственно после ЛП (0-е сутки) в МВН окраска по Л.Н.Нопге, основанная на свойстве глутаральдегида избирательно взаимодействовать с норадреналином в составе секреторных гранул [10], не позволяет отдифференцировать норадреналокиты от адреналокитов.

Так как размеры норадреналокитов, составляющих 80–90% всей популяции хромаффинокитов, стабильны до 21-х суток, реальный прирост доли хромаффинной ткани в этот период можно

объяснить в основном увеличением количества клеток. На 28-е сутки размеры адреналокитов и норадреналокитов и доля хромоаффинокитов максимальны, что свидетельствует о существенном вкладе клеточной гипертрофии в увеличение объёма паренхимы и достижение ею максимального прироста в данный период.

Выявленный уровень прироста хромоаффинной ткани в зоне выживания достаточен для быстрого восполнения погибших эндокриноцитов в этой области, но из-за торможения в поздние сроки он не сказывается заметным образом на увеличении абсолютного объёма всей неповреждённой части МВН. В результате, как и следует из гистологического исследования, выжившая часть надпочечника сохраняет прежнюю структуру, а орган после сокращения поражённой части принимает форму, соответствующую усечённой исходной [4]. В целом, динамика количественных показателей основных тканевых компонентов зоны выжившей части МВН свидетельствует о её нормализации к концу 2-го месяца после ЛП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г., Яблчанский Н.И. и Губенко В.Г. Системная стереометрия в изучении патологического процесса. М., Медицина, 1981.
2. Гамбарин Б.Л., Хамидов Р.И., Хорошаев В.А. и Постолов А.М. Лазерная резекция надпочечника. Клин. хир., 1988, № 12, с. 33–35.
3. Гуцол А.А. и Кондратьев Б.Ю. Практическая морфометрия органов и тканей. Томск, Изд-во Томск. ун-та, 1988.
4. Кемоклидзе К.Г., Александров Ю.К., Дворников М.В. и Тюмина Н.А. Гистологическая характеристика надпочечника крысы после воздействия хирургическим лазером на позднем этапе. Фунд. исслед., 2013, т. 10, ч. 14, с. 3087–1092.
5. Кемоклидзе К.Г. и Тюмина Н.А. Универсальный гистологический счётчик. Версия 2.0. Морфология, 2012, т. 141, вып. 3, с. 75–76.
6. Кемоклидзе К.Г. и Тюмина Н.А. Гистологическая характеристика надпочечника крысы после воздействия хирургическим лазером. Фунд. исслед., 2013, т. 8, ч. 4, с. 886–891.
7. Кемоклидзе К.Г. и Тюмина Н.А. Гистологическая характеристика надпочечника крысы после воздействия хирургическим лазером на среднесрочном этапе. Фунд. исслед., 2013, т. 10, ч. 5, с. 1084–1089.
8. Павлов А.В. и Кемоклидзе К.Г. Цитологические механизмы постнатального роста хромоаффинной ткани надпочечника. Онтогенез, 1998, т. 29, № 2, с. 123–128.
9. Honore L.H. A light microscopic method for the differentiation of noradrenaline and adrenaline producing cells of the rat adrenal medulla. J. Histochem. Cytochem., 1972, v. 19, № 8, p. 483–486.
10. Kobayashi S. and Coupland R.E. Morphological aspects of chromaffin tissue: the differential fixation of adrenaline and noradrenaline. J. Anat., 1993, v. 123 (pt. 2), p. 223–235.
11. Sparrow R.A. and 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.
12. Valvano J.W. Tissue thermal properties and perfusion. In: Optical-Thermal Response of Laser-Irradiated Tissue, 2nd edit. Dordrecht e. a. Springer, 2011, ch. 12, p. 455–485.
13. Vogl T.J., Lehnert T., Eichler K. et al. Adrenal metastases: CT-guided and MR-thermometry-controlled laser-induced interstitial thermotherapy. Eur. Radiol., 2007, v. 17, p. 2020–2027.
14. Welch A.J. and van Gemert M.J.C. Overview of optical and thermal laser-tissue interaction and nomenclature. In: Optical-Thermal Response of Laser-Irradiated Tissue, 2nd edit. Dordrecht e. a., Springer, 2011, ch. 1, p. 3–11.

Поступила в редакцию 22.05.2014

THE DYNAMICS OF QUANTITATIVE PARAMETERS OF RAT ADRENAL MEDULLA AFTER ITS PARTIAL LASER DESTRUCTION

K.G. Kemoklidze and N.A. Tumina

Morphometric methods were used to examine the dynamics of the quantitative parameters of the surviving portion of the adrenal medulla (AM) in Wistar rats (n=41) for 2 months after its laser damage. On paraffin sections of AM stained using L.H. Honore method, the volume fractions and the average cross-sectional areas of adrenalocytes and noradrenalocytes as well as the volume fractions of blood vessels, stroma and neurons were determined. The relative volume of the blood vessels reached its maximum value at Day 7, and that of the chromaffinocytes — at Day 28 of the experiment. The volume fractions of the stroma and neurons demonstrated no significant changes during the experiment. The original method was used to calculate the real decrease and increase in the volume of glandular parenchyma of the surviving portion of AM. The real decline of chromaffinocyte volume reached a maximum of 1.5% at Day 7, and the maximum real growth of 4.7% was observed at Day 28 (the growth rate amounted to 1–2.5% per week). Until Day 28 chromaffinocyte hyperplasia dominated in the regenerative processes, while on Day 28 the hypertrophy was also found to significantly contribute to it. By Day 56 the surviving zone of AM was normalized.

Key words: *adrenal gland, medulla, chromaffin tissue, laser damage, morphometry*

Department of Histology, Cytology and Embryology, Yaroslavl' State Medical Academy