

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Московская государственная академия
ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»**

УТВЕРЖДАЮ

проректор по науке и инновациям,
академик РАН

_____ Н.А. Балакирев

Кафедра анатомии и гистологии животных имени профессора А.Ф. Климова

ОТЧЁТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ ПО ТЕМЕ:

«Научное обоснование влияния криодеструкции на биологические ткани».
(договор № 55-10 от 15 октября 2015 г. с ООО «ИВЦ МВА»)

Руководитель:

Зав. кафедрой анатомии и гистологии
животных имени профессора А.Ф. Климова,
заслуженный деятель науки РФ,
д.б.н., профессор

_____ Н.А. Слесаренко

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время метод криогенной деструкции успешно применяют при лечении новообразований слизистых оболочек ротовой полости в медицине и ветеринарии [8-12,14,16].

Наряду с этим, некоторые теоретические аспекты криогенного воздействия, имеющие значение для совершенствования клинического применения метода, до сих пор недостаточно изучены. В частности, не вполне ясна картина первичного повреждения тканей слизистых оболочек. При этом особый интерес вызывает тот факт, что правильно выполненная криодеструкция новообразований обладает абластическим эффектом, поскольку гарантирует отсутствие метастазирования [7,13,15]. Более того, не выяснены морфологические корреляты механизма, предотвращающего метастазирование.

Предшествующие экспериментальные и морфологические исследования отражают общие вопросы первичного повреждения тканей [1,2,4-6], но в них не рассмотрено влияние локального замораживания на слизистые оболочки, которые нередко являются ареной манифестации патологического процесса. Несомненно, что базовые данные о структурных изменениях в очаге криодеструкции актуальны как для ветеринарной медицины, так и для медицины человека. Кроме того, они могут быть использованы в качестве одного из критериев при апробации криоаппаратуры на опытных объектах.

В этой связи нами проведены экспериментальные исследования, направленные на выявление особенностей повреждения тканей слизистых оболочек при аппликационной криодеструкции.

Цель исследования – выявить макро- и микроскопические изменения слизистой оболочки полости рта непосредственно после криодеструкции в эксперименте.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на кроликах породы Советская шиншилла, которым под масочным наркозом (Изофлюран) проводили криодеструкцию слизистой оболочки языка и верхней губы аппаратом Крио Еламед-1 с диаметром насадки 8 мм и температурой рабочей части -180°C в течение 30 секунд.

До этапа криодеструкции и после оттаивания области замораживания производили биомикроскопические исследования с помощью дерматоскопа HEINE DELTA 20, совмещённого с фотокамерой Nikon NIKON 3100D с помощью фотоадаптера по общепринятой методике (рис.1).

Дерматоскоп DELTA 20 делает видимыми структурные изменения кожи. Прибор наделён оптикой с высоким разрешением и системой ахроматических линз; десятикратное увеличение, неискаженное по всей плоскости, позволяет получать крупное и четкое изображение.

Светодиодное освещение (LED) приближено к дневному освещению. Шесть LED-источников фронтального освещения и режим бокового освещения при помощи 3 LED-элементов усиливают контрастность.

После биомикроскопии производили взятие биопсийного материала из очага криодеструкции с захватом окружающих тканей. Материал фиксировали в 10%-м растворе формалина, заливали в парафин, готовили срезы толщиной 5-6 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином и пикрофуксин-фукселином по общепринятым методикам [3]. Изучение гистологических срезов, микрофотосъёмку и микроскопическую морфометрию осуществляли с помощью микроскопа Jenamed, совмещённого с системой анализа микроскопических изображений ImageScore M.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изменения слизистой оболочки языка после криодеструкции

Биомикроскопические данные. Интактный язык при осмотре и биомикроскопии имел однородную структуру, его слизистая оболочка по всей площади поверхности характеризуется равномерным розовым цветом, отчётливо визуализируются мономорфные нитевидные сосочки и расположенные среди них грибовидные.

В ходе криодеструкции верхушки языка отмечали быстрое формирование ледяного фронта, который захватывал всю область воздействия. На границе области криодеструкции наблюдали выраженную зону демаркации в виде ободка гиперемии. В процессе оттаивания очаг криовоздействия приобретал неравномерную окраску за счёт чередования очагов гиперемии и цианоза, рельеф слизистой оболочки был сглажен за счёт отёка. После оттаивания, в течение 3-х минут, в области воздействия развивался выраженный отёк.

Микроскопические данные. Очаг криоповреждения имел полукруглую форму, в его центре структурные изменения распространяются на глубину $3,84 \pm 0,13$ мм, охватывая почти всю толщу языка ($3,97 \pm 0,1$ мм), а перифокально- на глубину до $2,08 \pm 0,12$ мм. В области криовоздействия обращают на себя внимание субэпителиальные пузыри, признаки нарушения микроциркуляции и выраженный отёк в собственной пластинке слизистой и мышцах языка. Граница между зоной криодеструкции и окружающими тканями на микроскопическом уровне чётко выражена. Признаки отёка имеют неодинаковую степень проявления: они максимально выражены в центре очага воздействия и регистрируются на глубине до $2,98 \pm 0,13$ мм, тогда как по его периферии отёк распространён на глубине до $2,33 \pm 0,1$ мм.

В эпителиальном пласте наблюдаются некробиотические изменения клеток в форме пикноза, некоторые клетки находятся в состоянии кариолизиса, очагово выражена дисконплектация клеток с нарушением вертикальной анизоморфии. В сосочках языка отмечается деструкция

эпителиально-соединительнотканного соединения за счёт развития субэпителиального отёка, что особенно ярко выражено в центре очага криодеструкции и в меньшей степени на его периферии.

В рыхлой соединительной ткани собственной пластинки слизистой (рис.5 Б) визуализируются отёк, тромбозы и стазы в сосудах гомомикроциркуляторного русла, очагово – деструкция стенок кровеносных капилляров (диаметр $14,1 \pm 3,7$ мкм), экстравазальное расположение форменных элементов крови. Лимфатические капилляры расширены, их диаметр составляет $10,8 \pm 3,7$ мкм. В некоторых сосудах наблюдается деструкция стенки.

В поперечно-полосатой скелетной мышечной ткани, составляющей основу языка, также обнаружены изменения сосудов микроциркуляторного русла и стромы. В кровеносных капиллярах эндо- и перимизия (диаметр от $7,5 \pm 1,5$ мкм до $14 \pm 1,46$ мкм) наблюдаются признаки стаза, очагово - деструкция стенки, что, очевидно, и приводит к кровоизлияниям. Эндотелий набухший и тёмный. Вены диаметром от $25,5 \pm 5,4$ до $45,8 \pm 6,9$ мкм расширены, их просветы умеренно полнокровны, в стенках наблюдается разволокнение коллагеновых волокон, что проявляется снижением плотности их композиции. Очагово видны расслаивающие кровоизлияния. В эндомизии и перимизии, которые сформированы рыхлой соединительной тканью, отмечается выраженный отёк межклеточного вещества, разволокнение пучков коллагеновых конструкций, заметное увеличение межволоконных пространств. Лимфатические сосуды резко расширены.

При этом в мышечных волокнах наблюдаются деструктивные изменения в виде очаговой утраты поперечной исчерченности и фрагментации саркоплазмы.

В глубине очага криодеструкции выражено резкое полнокровие венул и кровеносных капилляров и расширение (до $125 \pm 16,3$ мкм) лимфатических сосудов. Аналогичная картина наблюдается в маргинальных зонах очага криодеструкции. При этом на границе с окружающими тканями выявлена

группа кровеносных капилляров, венул и артериол с выраженным стазом и резкое расширение лимфокапилляров. Видны очаговые кровоизлияния, связанные с деструкцией стенок сосудов. Очаг криодеструкции непосредственно после воздействия оказывается демаркирован зоной выраженных сосудистых нарушений.

Изменения слизистой оболочки верхней губы после криодеструкции

Биомикроскопические данные. Интактная слизистая оболочка верхней губы (рис.9 А) при осмотре характеризуется однородной структурой, она гладкая, розовая и блестящая.

В процессе криодеструкции отмечено быстрое распространение ледяного фронта в тканях слизистой оболочки, причём на границе области криодеструкции была сформирована зона демаркации в виде ободка гиперемии. После оттаивания отмечена неравномерная окраска области криовоздействия: её центр выглядит анемичным, в то время как периферическая часть гиперемирована. Развитие отёка наблюдали в течение 2-3-х минут.

Микроскопические данные. Очаг криоповреждения распространяется на глубину $3,0 \pm 0,25$ мм, захватывая слизистую оболочку и мышечную основу верхней губы до кожного покрова.

В области воздействия незначительно выражены субэпителиальные пузыри, в собственной пластинке слизистой отёк и расширение кровеносных сосудов, скелетная мышечная ткань отёчна, с признаками нарушения кровообращения. Признаки отёка максимально выражены на глубине до $2,7 \pm 0,11$ мм в центре очага воздействия и на глубине $2,2 \pm 0,12$ мм по его периферии. Граница между зоной криодеструкции и окружающими тканями на микроскопическом уровне хорошо визуализируется.

В эпителиальном пласте наблюдаются некробиотические изменения клеток в форме пикноза, некоторые клетки находятся в состоянии кариолизиса.

В собственной пластинке слизистой имеют место признаки отёка, стазы, тромбозы, деструкция стенок кровеносных капилляров и кровоизлияния. Просветы венул расширены, умеренно полнокровны. Обращают на себя внимание изменения микрососудов лимфатического русла, которые увеличиваются в диаметре ($14,1 \pm 3,7$ мкм), многие находятся в состоянии лимфостаза.

В поперечно-полосатой скелетной мышечной ткани, составляющей основу верхней губы, примечательны структурные преобразования сосудов микроциркуляторного русла и стромы. В эндомизии и перимизии наблюдается выраженный отёк основного вещества. Лимфатические капилляры резко расширены, с явлениями лимфостаза. В кровеносных капиллярах, локализованных в эндо- и перимизии (диаметр от $7,5 \pm 1,5$ мкм до $14 \pm 1,46$ мкм), наблюдаются признаки стаза, кровоизлияния. Эндотелий набухший, тёмный. Венулы расширены, их диаметр составляет от $25,5 \pm 5,4$ до $45,8 \pm 6,9$ мкм, их просветы умеренно полнокровны, в стенках сосудов разволокнены коллагеновые волокна, что проявляется их рыхлым расположением. Артериальные сосуды с признаками разволокнения и отёка стенки, умеренно полнокровны. В мышечных волокнах наблюдается очаговая утрата поперечной исчерченности, фрагментация саркоплазмы.

Пристеночные слюнные железы в состоянии деструкции.

ВЫВОДЫ

Таким образом, непосредственно после криодеструкции языка и верхней губы выявлены выраженные нарушения крово- и лимфообращения, что сопровождается блокадой кровотока и развитием отёка.

При этом нами обнаружены как общие закономерности, так и топические особенности реакции на криовоздействие.

Общим закономерности повреждения выражаются в деструкции эпителиального пласта и волокон скелетной мышечной ткани. Выявленные гемодинамические сдвиги имеют специфические морфологические

проявления. Они характеризуются расширением микрососудов лимфатического звена микроциркуляторного русла и развитием лимфостаза. В гемокапиллярах развиваются стазы, тромбозы, деструкция стенок. В венах наблюдаются отёк стенки, полнокровие, иногда - расслаивающие кровоизлияния. Артериолы диаметром полнокровны, с признаками отёка стенок.

Что касается топических особенностей криовоздействия на изучаемые органы, то здесь следует подчеркнуть, что в тканях языка сосудистая реакция проявляется преимущественно геморрагическими явлениями и в меньшей степени лимфостазом. В тканях верхней губы, напротив, имеет место выраженный лимфостаз и в меньшей степени – образование экстравазатов.

Итак, в слизистых оболочках ротовой полости после криодеструкции возникают выраженные нарушения кровообращения с блокадой кровотока, что может быть связано как с изменением реологических свойств крови, так и с деструкцией сосудов. Выраженный отёк развивается непосредственно после воздействия. Наряду с этим возникают деструктивные изменения эпителиального пласта и мышечных волокон скелетной мускулатуры языка, а также пристеночных слюнных желёз.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Борхунова Е.Н. Особенности репаративной регенерации тканей после криодеструкции, СВЧ-криодеструкции и СВЧ-деструкции: Дис. ... д-ра мед. наук.– М., 2004. – 328 с.
2. Калмыкова З.В., Шафранов В.В. Применение криохирургии в условиях многопрофильной геронтологической клиники // Пластическая хирургия и косметология. – 2013, - №3. – С. 353-512

3. Микроскопическая техника: Руководство для врачей и лаборантов / Под ред. Саркисова Д.С., Перова Ю.Л. – М.: Медицина, 1986. – 216 с.
4. Таганов А.В. Современные технологии в лечении рубцовых гипертрофий. Экспериментальное и клиничко-морфологическое исследование. // Дис. д.м.н. – М., 2010. – 336 с.
5. Современные методы лечения в дерматокосметологии (криогенное и микроволновое воздействие: теоретические и практические аспекты) / б. Таганов А.В., Шафранов В.В., Борхунова Е.Н., Гладько В.В. М.: Изд-во «Контакт РЛ», 2007. 200 с.
6. Спиридонова Н.З. Криогенный метод лечения доброкачественных опухолей и опухолеподобных образований в челюстно-лицевой области (экспериментально-клиническое исследование). Дисс. докт. мед. наук. – М., 1990. – 260 с.
7. Caso J. R., et al. Complications and postoperative events after cryosurgery for prostate cancer." // BJU Int. 2012. 109(6): 840-845.
8. Hori A. Cryosurgery for E.N.T diseases // Low temperature Medicine, June 2013, vol 39 №2. P.46.
9. Moszynski, B., et al. Cryosurgery of precancerous conditions of the oral cavity and pharynx // Otolaryngol Pol. 1990. 44(4): 233-235.
10. Miller D. Cryosurgery for the treatment of neoplasms of the oral cavity. // Panminerva Med. 1975. 17(11-12): 366-368.
11. Natiella J. R., et al. issue response to cryosurgery of oral cavity in rhesus monkeys. // Arch Pathol. 1974. 98(3): 183-188

12. Ogava F., Lida T. Cryotherapy for oral and maxillofacial region, and cryosurgery for jaw bone tumor // Low temperature medicine, June 2013, vol 39, № 2, p 46.
13. Sverrisson E., et al. Cryosurgery for prostate cancer: a comprehensive review // Arch Esp Urol (2013). 66(6): 546-556.
14. Sumida S. Death of cell and tissue in cryosurgery // Jpn. Intervent Radiology, 2008, vol 23, 245-253. 2.
15. Tao Z., et al. Safety and effectiveness of cryosurgery on advanced pancreatic cancer: a systematic review. // Pancreas. 2012. 41(5): 809-811.
16. Zhang Y., et al. Cryosurgery for recurrent cancer of the oral cavity: experience in 5 cases. // Shanghai Kou Qiang Yi Xue. 2000. 9(1): 64.