

## СОВРЕМЕННАЯ КОНЦЕПЦИЯ РАЗРУШЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ ПРИ ЛОКАЛЬНОЙ КРИОДЕСТРУКЦИИ

© В.В. Шафранов<sup>1</sup>, Е.Н. Борхунова<sup>2</sup>, Д.И. Цыганов<sup>3</sup>,  
А.И. Торба<sup>4</sup>, А.В. Таганов<sup>5</sup>, Л.П. Межов-Деглин<sup>6</sup>,  
З.В. Калмыкова<sup>7</sup>, О.А. Подшивалова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>РНИМУ имени Н.И. Пирогова, Москва, 117997, Россия

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО МГАВМиБ имени К.И. Скрябина, Москва, 109472, Россия

<sup>3</sup>Московский Комитет по науке и технологиям, Москва, 119415, Россия

<sup>4</sup>Компания Hill's, Москва, 121614, Россия

<sup>5</sup>Государственный институт усовершенствования врачей МО РФ,  
Москва, 107392, Россия

<sup>6</sup>Институт физики твердого тела РАН, г. Черноголовка Московской области,  
142432, Россия

<sup>7</sup>Государственная клиническая больница № 60, Москва, 111123, Россия

***Аннотация** Представлены результаты исследований механизма первичного повреждения биологической ткани (на примере печени) после локальной криогенной деструкции. Показано, что первичное повреждение ткани связано с деформационными эффектами, возникающими в процессе замораживания–оттаивания; такое повреждение приводит к гибели сосудов микроциркуляторного русла. В дальнейшем развивается ишемический некроз ткани в области криовоздействия. Установлены причины ограничения возможностей криогенной деструкции тканей, а именно — плотность структуры тканей и интенсивный метаболизм, определяющий высокий уровень тепловыделения и приводящий в итоге к установлению стационарного состояния в объеме ткани.*

***Ключевые слова:** криохирургия, криодеструкция, первичное повреждение ткани.*

**Введение.** В последние годы вновь возник интерес к криогенному методу медицинской помощи, и появилось множество врачей, которые занимаются лечением ряда патологических образований, не представляя себе истинных возможностей и ограничений этих способов. Иллюзия простоты, доступности и безопасности локального замораживания, и особенно использование последнего не по показаниям, может, как это уже было ранее, полностью дискредитировать этот прекрасный метод.

Полагаем крайне важным еще раз представить наш, по сути, 40-летний опыт с разбором теории и морфологии криодеструкции, высказав соображения по ограничению и возможностям локальной криодеструкции.

Методы разрушения различных патологических образований с помощью низких температур нашли широкое применение в медицине,

что способствовало формированию нового направления, получившего название «криохирургия». Суть криодеструкции заключается в устранении патологического образования путем быстрого локального замораживания с помощью хладагента, наиболее удобным из которых является жидкий азот с температурой кипения  $-196^{\circ}\text{C}$ . Специальная криогенная аппаратура позволяет воздействовать на патологический очаг в режиме распыления или контактным способом с использованием криоаппликатора со специально подобранным активным накопчиком. Преимущества криохирургических операций по сравнению с традиционными очевидны: простота исполнения и в то же время высокая точность, бескровность и безболезненность. После криодеструкции не наблюдается заметной общей реакции организма, а регенерация протекает быстро и часто имеет органотипический характер. Все это обуславливает высокую эффективность лечения [1].

Указанные факторы привели к расширенному применению метода криодеструкции как в отечественных, так и в зарубежных клиниках. Несмотря на это, в области криохирургии существует целый ряд теоретических и практических тем, которые тесно связаны с вопросами о лечебных возможностях криогенного метода и о рациональных показаниях к его применению.

Так, несмотря на достигнутые успехи, технические возможности криогенного метода при лечении ряда заболеваний не гарантируют полную гибель патологической ткани. В связи с этим предпринимаются попытки усилить разрушающее действие криодеструкции, а также повысить ее управляемость. Среди методов усиления криодеструкции наиболее распространенным является применение повторных циклов «замораживания–оттаивания», введение в зону разрушения растворов лидокаина, адреналина, дистиллированной воды, создание предварительной ишемии, сочетание криовоздействия с предварительным СВЧ-или ультразвуковым воздействием [13, 14].

Существующие методы управления процессом криодеструкции сводятся к контролю температурного поля, оценке жизнеспособности методом дисперсии электропроводности, ультразвуковому мониторингу глубины замороженной зоны, моделированию на желатиновом геле или использованию мощных криогенных систем в комплексе со сложными электронными приборами [24].

Таким образом, для достижения высокой эффективности криовоздействия проблема локального низкотемпературного разрушения тканей должна решаться комплексно. Однако до сих пор не существует единого мнения в отношении механизмов повреждения биологических тканей при замораживании и оттаивании.

На наш взгляд, объяснение разрушающего действия низких температур только за счет внеклеточной и внутриклеточной кристаллизации воды с последующим ее оттаиванием [8, 13, 14, 23–26, 28–30]

для криохирургии является недостаточным, так как оно не учитывает структурные и метаболические особенности тканей. Очевидно, что в этой воде растворено большое количество других веществ, содержание которых на фронте кристаллизации может сильно отличаться от содержания в объеме, и физические свойства этой жидкости, например, температура затвердевания, вязкость и т. д. могут существенно отличаться от свойств чистой воды. Биологические ткани являются плотной, упругой и энергетически насыщенной системой. Так, в 1 см<sup>3</sup> находится 10<sup>12</sup>–10<sup>14</sup> клеток, а 1 г массы тела человека выделяет примерно в 10 000 раз больше тепла, чем 1 г Солнца [4, 11]. Поэтому для организма человека криодеструктор с контактным активным наконечником площадью порядка квадратного сантиметра является точечным источником холода даже при условии использования высокопроизводительной криогенной установки для охлаждения наконечника.

Для понимания механизма криодеструкции целесообразно обсудить вкратце физическую структуру тканей, которая, по мнению авторов [18], представляет собой многокомпонентную жидкокристаллическую систему с высокой степенью упорядоченности и способностью к самовосстановлению в результате метаболических процессов.

Внутреннее состояние биологических объектов весьма устойчиво, в структуре их существенную роль играет связанная вода [20]. Нарушение этой структуры даже при сохранении архитектоники клетки может свидетельствовать о ее гибели, в том числе и при понижении температуры [5, 6].

В процессе криогенной деструкции связанная вода биологических тканей играет важную роль. Как отмечено выше, свойства и температура кристаллизации связанной воды существенно отличаются от таковых у обычной, «чистой» воды [2, 4, 16, 23, 27].

До сих пор не существует стройной концепции механизма первичного повреждения биологических тканей при криодеструкции. Большинство криохирургов традиционно придерживаются теории Р. Mazur [27] о двухфазном механизме криодеструкции. Согласно этой теории, деструкция тканей обусловлена внутриклеточной и внеклеточной кристаллизацией воды, которая сопровождается возникновением механических напряжений в объеме из-за разницы в удельной плотности воды и льда, и последующим оттаиванием, за счет чего повреждаются клеточные мембраны, возникает деструкция и в дальнейшем некроз клетки.

Однако эта теория была создана на основании изучения режимов криоконсервации суспензий клеток и не может быть полностью экстраполирована на ткань. Двухфазная теория криодеструкции клеток не учитывает ряд важных факторов: во-первых, теплофизические свойства ткани, связанные в первую очередь с процессами микроциркуляции и тканевым метаболизмом; во-вторых — состояние воды в ткани;

в-третьих — ориентацию слоев ткани относительно контактного нако-  
нечника криодеструктора; в-четвертых — естественную криопротек-  
цию живой ткани, связанную со сложной системой внутритканевых и  
внутриорганных регуляторных взаимодействий.

В настоящее время общепризнано, что вклад сосудистых нару-  
шений в развитие крионекроза не уступает значению термического  
повреждения. Считают, что процесс криодеструкции ткани включает  
2 этапа: первичное повреждение, связанное с непосредственной  
деструкцией клеток под влиянием низкой температуры, и вторичное  
повреждение, обусловленное гибелью патологической ткани в резуль-  
тате нарушения гемодинамики и в ходе асептического воспаления.

Экспериментальные данные по количественному анализу роли со-  
судистых нарушений в развитии крионекроза немногочисленны [3, 7,  
9, 15, 17, 19]. В то же время практика показывает, что при ряде за-  
болеваний аппаратная криодеструкция не гарантирует полную гибель  
патологической ткани. Вызывает сомнение эффективность некоторых  
распространенных методик воздействия, а именно — аппликации и  
распыления жидкого азота, при которых скорость охлаждения ткани  
мала. Наши предшествующие исследования показывают, что ограни-  
чение возможностей криогенного метода во многом обусловлено те-  
плофизическими свойствами тканей [21]. Установлено, что два факто-  
ра определяют успех криодеструкции:

1) достаточно высокая теплопроводность, точнее температурпро-  
водность, ткани (если теплоемкость и тепло, выделяемое при затвер-  
девании, т. е. теплота плавления, велики, то только высокой теплопро-  
водности может не хватить для замораживания сколь-нибудь заметно-  
го объема ткани за разумное время);

2) высокая скорость охлаждения.

К сожалению, практические врачи не всегда учитывают эти важ-  
нейшие факторы, что зачастую приводит к необоснованному исполь-  
зованию криогенного лечения и, как следствие, к неадекватной оценке  
его эффективности.

С учетом реальных возможностей метода криодеструкции очевид-  
но, что перспективы дальнейшего развития криохирургии подразуме-  
вают в первую очередь решение вопроса об усилении криовоздей-  
ствия с сохранением всех преимуществ низкотемпературного метода  
лечения. Наш опыт показывает, что среди многочисленных методов  
усиления криодеструкции наиболее эффективным оказалось сочета-  
ние предшествующего облучения высокочастотным электромагнит-  
ным полем (СВЧ-облучения) с последующей аппаратной криодеструк-  
цией [22, 31].

Таким образом, в области криохирургии существует ряд вопро-  
сов, требующих ответа или детализации. Во-первых, это вопрос о

механизме повреждения тканей при криовоздействии; во-вторых, о факторах, ограничивающих объем зоны крионекроза, и в-третьих, об эффективном усилении криодеструкции без утраты ее основных положительных свойств. Эти вопросы, на наш взгляд, должны решаться комплексно. Поэтому в настоящей работе представлены результаты наших работ, проводимых в данном направлении с 1973 г. по настоящее время.

Цель данной работы — представить нашу концепцию о механизме деструкции и характере регенерации тканей после криодеструкции или комбинированного СВЧ-криогенного воздействия с учетом особенностей теплофизических свойств живой ткани и на этом основании дать рекомендации для клинической практики.

**Материалы и методы.** Для выявления структурных изменений ткани, характеризующих механизм ее первичного повреждения, мы провели серию морфологических исследований. Объектом исследования служила ткань печени кроликов и белых крыс, которая является моделью гемангиомы, будучи близка к ней по теплофизическим свойствам и структуре сосудистого русла. Структура сосудистого русла печени наиболее удобна для оценки изменений, происходящих в сосудах разных калибров и разного функционального назначения (пути притока и оттока крови, трофическое звено). При этом большой интерес представляет механизм первичного повреждения и связанные с ним закономерности дальнейшей регенерации поврежденной ткани.

Крысам и кроликам под кеталаровым наркозом проводили лапаротомию, в рану выводили долю печени. Животным 1-й группы осуществляли криодеструкцию аппаратом заливного типа конструкции РГМУ (температура наконечника  $-160^{\circ}\text{C}$ , диаметр насадки — 8 мм, время экспозиции — 1 мин). Животным 2-й группы проводили комбинированное СВЧ-криогенное воздействие (предварительное облучение СВЧ-полем с помощью аппарата «Яхта» контактным способом при диаметре излучателя 25 мм и мощности 5 Вт, время экспозиции 1 мин; затем криодеструкция, экспозиция — 1 мин). Для изучения острых изменений, возникающих в ткани печени, животных выводили из опыта через 1,5 и 24 ч. Материал для гистологических исследований фиксировали в 10 %-м нейтральном растворе формалина, заливали в парафин по общепринятой методике. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином по Ван-Гизону, орсеином по Браше. Для электронно-микроскопических исследований образцы фиксировали в 2,5 %-м растворе глутарового альдегида на 0,2 М какодилатном буфере. Для исследования методом сканирующей электронной микроскопии образцы промывали в дистиллированной воде, дегидратировали в растворах ацетона восходящих концентраций и высушивали методом перехода через критическую точку на приборе Hithachi. Высушенные

образцы наклеивали на столики, напыляли сверху тонкий слой меди и изучали их структуру с помощью микроскопа Philips SEM 515. Образцы ткани для исследования методом трансмиссионной электронной микроскопии после промывки дегидратировали в спиртах восходящих концентраций и окиси пропилена и заливали в эпон по общепринятой схеме. Ультратонкие срезы окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца и исследовали на микроскопе Phillips.

**Определение теплопроводности тканей.** Теплофизические характеристики ткани изучали на специальном стенде в НИИ вакуумной техники им. С.А. Векшинского. В этих исследованиях мы воспользовались консультациями Д.И. Цыганова. Динамику образования льда в тканях изучали методом ЯМР-спектроскопии на кафедре биофизики МГУ им. М.В. Ломоносова. В постановке этой работы активное участие принял Г.Н. Николаев.

**Методика изучения реакции органного кровотока на криовоздействие.** Эксперимент проведен на 12 кроликах породы шиншилла (масса 2,8 кг). Его суть заключалась в определении времени транзита радиоактивного препарата ксенона ( $\text{Xe}^{133}$ ) через печень, что отражало состояние органного кровотока. Перед операцией кроликам в прямую кишку вводили радиоактивный ксенон ( $\text{Xe}^{133}$ ). Под тиопенталовым наркозом проводили лапаротомию, осуществляли доступ к печени и проводили криодеструкцию криоапликатором заливного типа (диаметр наконечника 25 мм, температура рабочей части  $-160^\circ\text{C}$ , экспозиция — 6 мин). Замораживанию подвергали около 20 % объема органа. Контроль времени транзита радиоактивного ксенона осуществляли до криодеструкции, во время процедуры и после нее с помощью комплекса Gamma-H, в состав которого входит сцинтилляционная  $\gamma$ -камера (LFOV, Голландия), сопряженная с компьютером рдр 11/34 (ДВС, США).

**Результаты и обсуждение. Реакция органного кровотока на криовоздействие.** Проведенные исследования показали, что время прохождения радиоактивного ксенона через печень до проведения криовоздействия и по окончании процесса криодеструкции практически не отличается и составляет  $M = 24,7 \pm 1,3$  и  $23,6 \pm 2,0$  с соответственно (табл. 1). Очевидно, что органный кровоток при криовоздействии не претерпевает заметных изменений. Полученные данные свидетельствуют о том, что действие низкой температуры носит строго локальный характер: это действие происходит на уровне микроциркуляторного русла и не вносит существенных изменений в гемодинамику органа. Оно не сопровождается в дальнейшем болевым синдромом и заметной общей реакцией организма.

Очевидно, что используемый криоинструмент для организма в целом является точечным источником холода; криовоздействие на био-

ткань можно сравнить с погружением небольшого холодного предмета в объемную «раскаленную ванну». Тепловая реакция окружающих тканей, обусловленная активацией метаболических процессов в организме, быстро компенсирует снижение температуры перифокально от области воздействия. Важно подчеркнуть, что стабильность кровотока при действии низкой температуры указывает на стабильность метаболических процессов, что необходимо учитывать при расчетах тепловых взаимоотношений криоинструмента и ткани.

Таблица 1

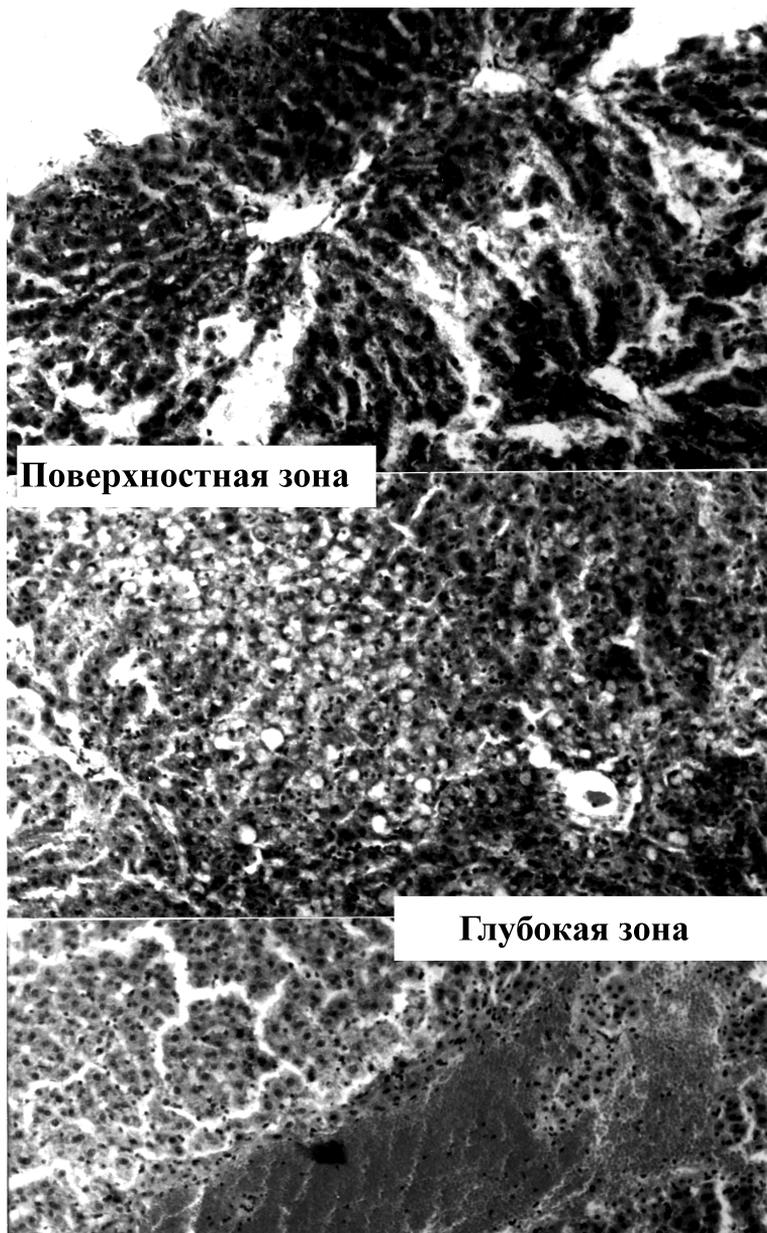
**Транзит радиоактивного препарата  $\text{Xe}^{133}$  через печень кролика до и во время криовоздействия**

Период определения транзита $\text{Xe}^{133}$	Скорость транзита $\text{Xe}^{133}$ , с		M	$\pm\delta$	$\pm m$	Ошибка
	max	min				
До криовоздействия	32,00	18,00	24,75	4,47	1,29	2,32
Во время криовоздействия	39,00	13,00	23,67	6,96	2,01	3,71

**Результаты морфологических исследований.** В контроле ткань печени крысы состоит из хорошо структурированных долек, в которых четко различимы печеночные балки. Последние состоят из гепатоцитов с эозинофильной цитоплазмой, богатой митохондриями, с хорошо развитой эндо-плазматической сетью и комплексом Гольджи, включениями гликогена и липофусцина, и содержащей микротельца. Ядро клеток крупное, округлое, с хорошо различимым ядрышком. Печеночные балки ветвятся и сходятся около центральных вен. Просвет кровеносных капилляров пуст, сосуды выстланы уплощенными эндотелиоцитами, в стенках хорошо различимы клетки Купфера, пространства Диссе четко выражены. Просветы центральных и воротных вен пусты или умеренно кровенаполнены, в стенках сосудов четко различаются эндотелиальная выстилка, а также волокнистый каркас, включающий коллагеновые волокна и эластические мембраны. Портальные тракты хорошо выражены, артерия, вена, лимфатический сосуд и желчный проток окружены тонким слоем соединительной ткани.

Через 1 час после криодеструкции выявлено, что степень повреждения ткани в области воздействия зависит от глубины расположения ее относительно криоаппликатора. В очаге воздействия видны две зоны: поверхностная, распространяющаяся на глубину 1,5–2 мм и глубокая, шириной 3–4 мм (рис. 1, а).

В поверхностной зоне явления деструкции выражены максимально (см. рис. 1, а). Глиссонова капсула разрушена, с кровоизлияниями,



**Рис. 1. Печень крысы через 1 час после криодеструкции:**

А — в области воздействия определяются поверхностная зона с разрывами ткани и некрозом гепатоцитов и глубокая зона с явлениями отека, тромбоза сосудов и кровоизлияниями. Окраска гематоксилином и эозином, об. 10, ок. 8;

Б — разрушение мелкой вены: стенки (ст) с очагами разрушения, к ним прилежат тромбоциты (т). В просвете сосуда (пр) видны агрегаты эритроцитов (эр), макрофаг (мф) и слущенная эндотелиальная клетка (энд); гц — гепатоциты. Электроннограмма, ув. 4900;

В — вакуольная дистрофия гепатоцита (гц), гомогенизация митохондрий (мит). В просвете синусоида (пр) явления образования тромба: видны тромбоциты (тр), прилежащие к стенке сосуда, и агрегат эритроцитов (эр). Клеточная мембрана, кариолемма (кл) не нарушены. Я — ядро, яд — ядрышко, кГ — комплекс Гольджи, энд — эндотелиальная клетка. Электроннограмма, ув. 3300

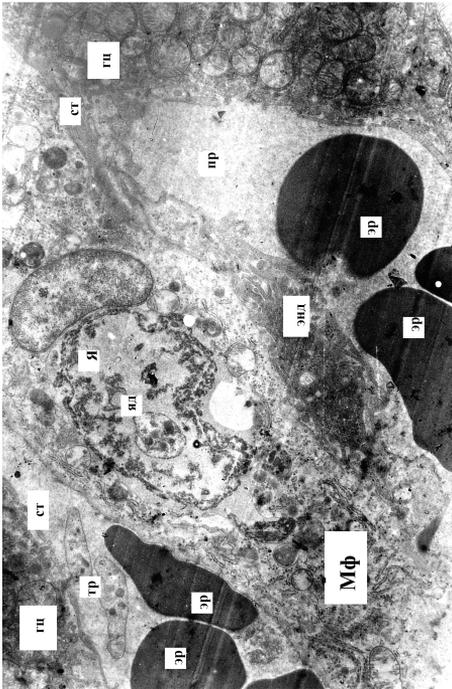
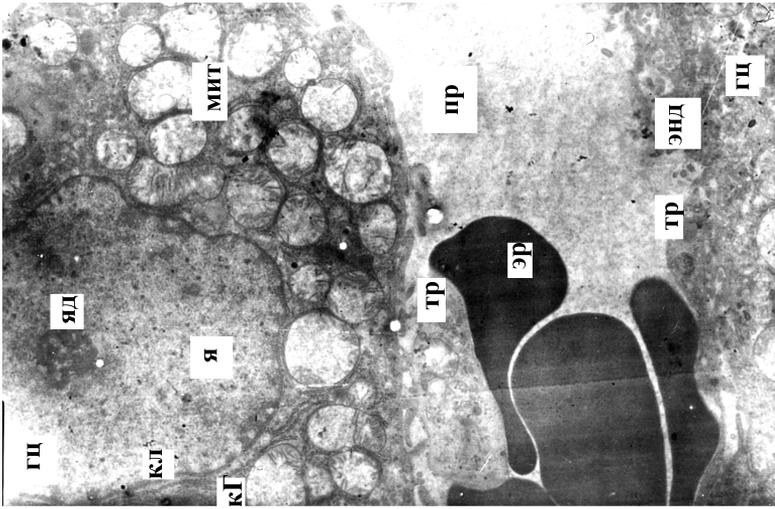
ее коллагеновые волокна разволокнены, отечны, эластические волокна фрагментированы. В паренхиме выявлена деструкция сосудов всех калибров, при этом за счет разрушения крупных ветвей воротной вены (диаметр до 500 мкм) формируются крупные разрывы печеночной ткани (см. рис. 1, *а*). Только в этой зоне отмечен непосредственный некроз гепатоцитов, который определяется на глубине около 300 мкм от поверхности органа (рис. 1, *б*). В гепатоцитах определяется разрушение мембран, отек цитоплазмы, явления карioreксиса.

В глубокой зоне выявляются деструкция сосудистых стенок и нарушение реологических свойств крови в форме тромбозов (см. рис. 1, *а*). Гепатоциты находятся в состоянии вакуольной и гиалиново-капельной дистрофии, отмечается отек цитоплазмы и органелл (рис. 1, *в*).

В данный срок уже видны эпизоды миграции единичных сегментоядерных нейтрофилов через стенки центральных и воротных вен в паренхиму, что свидетельствует о воспалительной реакции.

Как видно, после криодеструкции основные изменения отмечаются в сосудистом русле печени, на состоянии различных морфологических и функциональных звеньев которого следует остановиться подробно, так как это имеет ключевое значение для понимания механизма первичного повреждения ткани.

Пути притока крови — ветви портальной вены (рис. 2, *а*, *б*). Крупные ветви воротной вены (табл. 2) резко расширены, что может быть связано с рефлекторной вазодилатацией после оттаивания. Стенки отечны, с очагами разрывов, доходящих до адвентициального слоя, и расслаивающимися кровоизлияниями. Полнослойных разрывов не выявлено. Коллагеновые волокна в стенках расположены разрозненно, с явлениями разволокнения фибрилл. Поперечная исчерченность коллагеновых волокон сохраняется. Это указывает на относительную сохранность коллагеновых структур сосудов после криовоздействия. Эндотелиоциты с явлениями вакуольной дистрофии и некроза. Просветы воротных вен obturированы фибриновыми, красными и смешанными тромбами, характерными для коагуляционных воздействий и быстрого свертывания крови. Периваскулярно видны обширные кровоизлияния, распространяющиеся по синусоидным пространствам, которые более обширны в глубокой зоне. Просветы вен портальных трактов в поверхностной зоне с множественными очагами деструкции; наблюдается экстравазальное расположение форменных элементов крови и кровоизлияния. В глубокой зоне эти сосуды с очаговой деструкцией стенок. В волокнистом остове сосудов определяется отек и разволокнение коллагеновых волокон, фрагментация эластических волокон. Просветы сосудов obturированы фибриновыми или смешанными тромбами либо плазмой, вспененной пузырьками газа, что может быть связано с эффектом пучения [9, 10].



**Рис. 2. Печень крысы через 1 час после криодеструкции:**

А — красный и фибриновый тромбы, обтурирующие в крупные ветви воротной вены; ↑ — участки разрывов стенки. Окраска гематоксилином и эозином, об. 4, ок. 8;

Б — стенка воротной вены гомогенизирована, на ней видны «глыбки» основного вещества. Сканоэлектроннограмма, ув. 63;

В — участок разрыва стенки воротной вены (фрагменты стенки показаны стрелками) с паравазальным кровоизлиянием. Перифокально видны синусоиды в состоянии деструкции и гепатоциты в состоянии некроза. Окраска гематоксилином и эозином, об. 10, ок. 8;

Г — фрагменты разрушенной стенки воротной вены (↑) среди экстравазата в поверхностной зоне очага некроза. Окраска по Ван-Гизону, об. 20, ок. 10;

Д — в просветах разрушенных синусоидов видны фибрин (↑) и форменные элементы крови. Сканоэлектроннограмма, ув. 63

Трофическое звено — синусоиды — полностью разрушены, их стенки разорваны, синусоидные пространства заполнены кровью и/или фибрином (рис. 2, в, з, д). В поверхностной зоне области воздействия отмечается разрушение пространств Диссе, некроз эндотелиоцитов и клеток Купфера. В глубокой зоне в пространствах Диссе не определяются отростки гепатоцитов и наблюдается заполнение гомогенной электроноплотной субстанцией, что может быть связано с явлениями отека. Отмечается разрушение эндотелиальных клеток и клеток Купфера и их слущивание в просвет сосудов. В некоторых синусоидах, расположенных вблизи порталных трактов, находятся пузырьки газа.

Пути оттока крови — центральные вены — в поверхностной зоне разрушены (рис. 2, з). В глубокой зоне просветы этих сосудов резко расширены, стенки с очагами деструкции и отеком, однако волоконный остов стенок сохранен. Просветы вен могут быть пусты, полнокровны, содержать фибрин или плазму, вспененную многочисленными пузырьками газа. Наблюдаются периваскулярные отеки и кровоизлияния *per hexis* и *per diapedesin*, распространяющиеся по синусоидным пространствам.

Таким образом, ранние изменения в ткани печени после криовоздействия характеризуются следующими параметрами. В области, располагавшейся под криоапликатором, возникают некротические и дистрофические изменения гепатоцитов, разрывы ткани печени с фрагментацией печеночных балок. В сосудистом русле наряду с деструкцией стенок сосудов в приносящем звене (ветви печеночной артерии, воронные вены) возникают стазы и тромбозы, а в выносящем звене (синусоиды, центральные вены) — стазы и запустевание просветов. Это свидетельствует о блокаде микроциркуляции в результате деструкции стенок сосудов и изменения реологических свойств крови. Кроме того, в ткани в области криодеструкции отмечается вспенивание плазмы и крови в сосудах и выход пузырьков газа в периваскулярные пространства.

Эти изменения связаны, очевидно, с эффектом пучения в крови, который заключается в повышении растворимости газов в крови при охлаждении ткани и последующем освобождении их при оттаивании (по типу кесонной болезни). Изменения клеток, по-видимому, носят неодинаковый характер. В поверхностной зоне происходит прямое разрушение всех клеток стромы и паренхимы, что связано с более выраженным замерзанием ткани под криоапликатором. В глубокой зоне деструкция эндотелиоцитов и клеток Купфера, очевидно, связана с расположением их на границе двух сред: жидкой (кровь) и более плотной (стенки сосудов, а в случае синусоидов — пространство Диссе). Дистрофические изменения гепатоцитов носят, по всей вероятности, вторичный характер и связаны с трофическими расстройствами.

**Характер изменений в сосудах различного диаметра в области криодеструкции**

Тип сосуда	Диаметр сосуда, мкм	Характер изменений
Вены портальных трактов: деструкция стенок, периваскулярный отек, кровоизлияния, тромбозы	40–50	Отек волокнистого каркаса и очаговая деструкция
Центральные вены долек	40–80	Очаговая деструкция, отек коллагенового каркаса стенок, периваскулярные кровоизлияния, отек
Синусоиды	5–7	Деструкция стенок, фибриновые тромбы, кровоизлияния
Ветви воротной вены	от 240–400 до 720	Гиперемия, расширение просвета, отек и очаговая деструкция стенок, тромбозы, кровоизлияния

Лишь через 24 часа в области криовоздействия на фоне блокады кровотока развивается тотальный некроз гепатоцитов в области воздействия и происходит четкая демаркация детрита (рис. 3). Очевидно, что некроз клеток во всем объеме криоповреждения имеет ишемический, вторичный характер. Понятно, что это противоречит утверждениям работ [25, 27–29], согласно которым основным механизмом повреждения тканей является внутриклеточная и внеклеточная кристаллизация, приводящая к первичному разрушению клеточных структур.

Полученные данные убедительно показывают, что при криодеструкции первично возникают:

1) механическое повреждение всех элементов ткани, расположенных под криоапликатором;

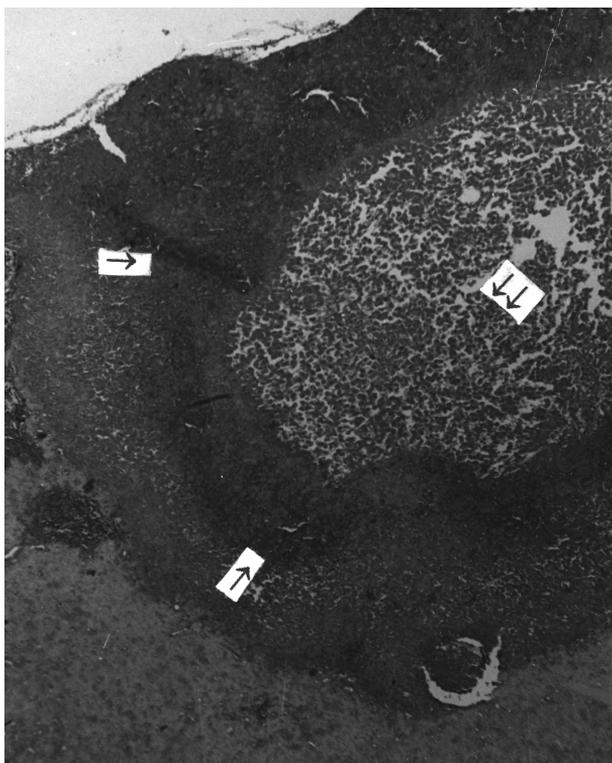
2) повреждение сосудистых стенок и нарушение реологических свойств крови. Это связано с развивающимися в ткани при локальном охлаждении напряжениями (по некоторым данным, до  $30 \text{ кг/см}^2$ ), которые лежат в основе эффектов пучения и смещения, а также в какой-то степени, с повреждениями элементов ткани кристаллами льда. Поскольку мишенью для криодеструкции является вода, а наибольшее ее количество сосредоточено в сосудах, то наибольшему разрушению подвергается сосудистое русло ткани.

Механические повреждения состоят в следующем.

1. Деструкция сосудов:

а) полное разрушение синусоидов и части центральных и портальных вен в поверхностных слоях очага крионекроза;

б) очаговая деструкция стенок крупных ветвей воротной вены, портальных и центральных вен в поверхностных и глубоких слоях очага крионекроза.



**Рис. 3.** Печень крысы через 24 часа после криодеструкции. Четко просматривается очаг некроза, включающий зону детрита (↑) и зону демаркации (⇓). Окраска гематоксилином и эозином, об. 4, ок. 8

2. Прямое повреждение и некроз клеток, расположенных на глубине до 300 мкм от поверхности активного наконечника криоинструмента.

Наряду с механическими повреждениями при криодеструкции возникают изменения реологических свойств крови, характерные для коагуляционного воздействия и, в частности, охлаждения, а именно — возникновение стазов, тромбозов, выпадение обширных отложений фибрина.

Кроме того, после цикла «замораживание–оттаивание» в объеме возникают рефлекторные реакции со стороны сосудистого русла, выражающиеся в длительной вазодилатации.

Деструкция сосудов и нарушение реологических свойств крови приводят к блокаде кровотока в очаге криовоздействия, формированию очага ишемии и развитию воспалительной реакции. Тотальный некроз гепатоцитов в области воздействия, а также некротические изменения сосудистых стенок развиваются в течение 24 часов после криодеструкции. Следовательно, некроз большинства клеток в области криодеструкции развивается вторично, по причине ишемии. Лишь часть клеток на глубине до 300 мкм гибнет под криоапликатором

непосредственно в результате прямого повреждения.

Таким образом, после криодеструкции в ткани печени происходят следующие изменения.

Первичные:

- деструкция стенок сосудов микроциркуляторного русла;
- изменение реологических свойств крови;
- некроз гепатоцитов в области контакта с криоапликатором.

Вторичные:

- развитие ишемического некроза ткани;
- воспалительная реакция.

**Результаты изучения теплофизических характеристик тканей.**

Насыщенные водой биологические ткани *in vitro* обладают низкой теплопроводностью  $\lambda$  (в среднем порядка 0,5 Вт/(м·К)), большой удельной теплоемкостью  $C$  (порядка 4 кДж/(кг·К)), т. е. низкой температуропроводностью ( $\alpha = \lambda/\rho C$ ), и довольно высокой теплотой плавления ( $\sim 320$  кДж/кг), которую необходимо отвести от замораживаемого объекта, что, естественно, сильно ограничивает возможности применения криогенного метода лечения. К тому же теплоемкость воды почти вдвое выше теплоемкости льда вблизи точки плавления, а теплопроводность воды почти вчетверо ниже, чем льда. Именно поэтому вопросы о зависимости степени деструкции ткани от количества образовавшегося льда и от теплофизических характеристиках тканей до и после замораживания относятся к числу важнейших при обсуждении эффективности методов криохирургического воздействия.

В 80-е годы на кафедре детской хирургии РГМУ были проведены измерения коэффициента теплопроводности  $\lambda$ , который в значительной мере определяется содержанием влаги в объекте, нормальных тканей (печень, кожа, жировая ткань), патологических тканей (гемангиом, меланом, келоидов, десмоидов) и желатинового геля (удобный модельный объект) до, во время и после замораживания, а также динамики льдообразования в тканях при охлаждении. Исследования проводили в диапазоне температур от 25 °С до 25 °С с учетом возможности изменения температуры затвердевания жидкости по мере движения фронта кристаллизации и степени ее переохлаждения по сравнению с чистой водой. При изучении теплопроводности указанных объектов было установлено, что при температурах выше 0 °С в процессе охлаждения величина  $\lambda$  падает пропорционально температуре. В области отрицательных температур,  $T \leq 0$  °С, начиная от температуры затвердевания жидкости, коэффициент теплопроводности ткани  $\lambda$  резко возрастает, т. к. теплопроводность льда почти в 4 раза выше теплопроводности воды. Поскольку температура затвердевания «свободной воды» в ткани сильно зависит от содержания растворенных в ней

веществ, по мере понижения температуры и движения фронта кристаллизации вглубь ткани здесь наблюдается плавное повышение  $\lambda$  в некотором интервале температур.

При высокой скорости замораживания и охлаждении ткани ниже  $-20^\circ\text{C}$  отмечено уменьшение скорости роста  $\lambda$ . Это можно связать с разрушением структуры ткани и образованием микро- и макротрещин вследствие накопления механических напряжений в объеме и фазового перехода льда из гексагональной в кубическую структуру при температурах ниже  $-20^\circ\text{C}$ , т. е. возникновением дополнительного теплового сопротивления в объеме замороженной ткани. Более того, в диапазоне от  $-20^\circ\text{C}$  до  $-180^\circ\text{C}$  мы наблюдали некоторое снижение теплопроводности тканей гемангиом и меланом.

Измерения теплопроводности различных тканей показали, что при комнатных температурах различия в теплопроводности не слишком велики: теплопроводность  $\lambda$  максимальна в ткани гемангиом  $\sim 1,6 \text{ Вт}/(\text{м}\cdot\text{К})$  и печени  $\sim 1,4 \text{ Вт}/(\text{м}\cdot\text{К})$ , и минимальна в жировой ткани  $\sim 0,4 \text{ Вт}/(\text{м}\cdot\text{К})$  и коже  $\sim 0,5 \text{ Вт}/(\text{м}\cdot\text{К})$ . Было установлено, что величина  $\lambda$  (а следовательно, чувствительность ткани к криовоздействию) зависит от содержания влаги в ткани. Кроме того, было выявлено увеличение  $\lambda$  на 10–20 % после повторных циклов «замораживание–оттаивание», что авторы связывают с освобождением части связанной воды в результате деструкции ткани.

Наблюдения динамики образования льда методом ЯМР показали, что количество образующегося льда зависит от содержания в ткани свободной воды: так, в наиболее влагонасыщенной ткани гемангиомы (76 % свободной воды) в лед переходит более 60 % воды. Затвердевание жидкости сопровождается значительным выделением тепла, что оказывает существенное влияние на динамику развития зоны замораживания и ограничивает ее максимальные размеры. Показано, что размеры зоны замораживания определяются в первую очередь степенью развития сосудистого русла и физической структурой ткани.

При анализе физических основ процесса локального замораживания принято подразделять воду, содержащуюся в ткани и составляющую 90 % ее массы, на 3 условных типа: свободную (которая превращается в лед при температурах от 0 до  $-15^\circ\text{C}$ ), слабосвязанную с тканью (затвердевает при температурах ниже  $-15^\circ\text{C}$ ) и прочно связанную, которая может оставаться в жидком состоянии вплоть до температур порядка  $-90^\circ\text{C}$ . Именно физическая структура ткани, в частности, соотношение между типами заключенной в ней воды, а также степень развития микроциркуляторного русла во многом определяют объем промораживания в процессе криовоздействия на биологические ткани [20].

Стабильность органного и общего кровотока свидетельствует о том, что при локальном криовоздействии организм «не замечает» этого воздействия. В то же время на тканевом уровне здесь происходят изменения микроциркуляторных процессов и местного метаболизма.

Мы отмечали, что основными факторами, определяющими эффективность локального криовоздействия, являются скорость охлаждения и теплопроводность тканей. Важно отметить, что скорость охлаждения ткани быстро падает с глубиной, т. е. движение фронта кристаллизации быстро замедляется. При высокой начальной скорости охлаждения перепад температур между движущимся фронтом кристаллизации и поверхностью ткани, прилегающей к активному наконечнику, который охлаждается жидким азотом, может достигать сотни градусов. Поэтому механические напряжения, возникающие в объеме ткани вследствие разницы в удельных объемах жидкости и льда, и термомеханические напряжения, которые возникают в объеме «растущего ледяного шарика» под действием градиента температуры, а также вследствие фазового перехода во лед, могут приводить к деформации, сопровождаемой вспучиванием, взаимным смещением разнородных участков ткани, образованием трещин, что приводит к повреждению клеточных мембран и деструкции ткани. Поверхность растущего ледяного шарика при локальном замораживании увеличивается пропорционально квадрату радиуса, что приводит к быстрому возрастанию тепловыделения на границе раздела твердое тело-жидкость и увеличению плотности теплового потока, направленного от окружающей теплой ткани к холодному активному наконечнику. В результате, через некоторое время ледяной фронт практически останавливается. Для клинициста это означает, что дальнейшее увеличение времени экспозиции при криовоздействии на патологическое образование практически бесполезно.

Математическое моделирование процесса криовоздействия с учетом деталей теплообмена между активным наконечником криоапликатора и замораживаемой тканью позволяет в принципе выбирать оптимальный режим проведения операций [20, 32]. При построении математических моделей следует учитывать, что развитие процессов криодеструкции носит вероятностный характер, так что результаты подобного моделирования всегда приближительны. Полезные для качественных оценок результаты расчетов конфигурации предельных зон замораживания с помощью метода электроаналогий приведены в материалах [20].

На основании анализа температурных кривых, представленных в литературе, нам удалось построить усредненную кривую распределения температуры в зоне замораживания в зависимости от времени

криовоздействия (рис. 6). Согласно полученным данным, оптимальные параметры режима криовоздействия расположены внутри площади, ограниченной подъемом кривой и началом плато. Если используется мощный криоаппарат, то кривая пойдет более круто, но вид выявленной зависимости не изменяется. Оптимальное расчетное время криодеструкции составляет около 20 мин, реальное около 15 мин. Далее наступает стационарное состояние, и дальнейшее криогенное воздействие не приводит к увеличению зоны замораживания, т. е. не имеет смысла.

Измерения распределения температуры в тканях при криовоздействии показали, что в начальный момент на поверхности ткани, которая контактирует с активным наконечником, охлаждаемым жидким азотом, температура довольно быстро достигает  $-160^{\circ}\text{C}$ , т. е. скорость охлаждения достаточно высока, но через 7–8 мин после начала криовоздействия температура ткани на глубине 1,5–2,5 см составляет всего  $0^{\circ}\text{C}$ , что свидетельствует о достижении стационарного состояния, когда фронт кристаллизации практически останавливается.

Таким образом, живые ткани сами как бы «регулируют» протекание процесса локального криовоздействия, ограничивая глубину зоны замораживания даже при применении криоаппаратов с большой холодопроизводительностью. В связи с этим исчезает иллюзия возможности обеспечения программного замораживания большого объема ткани повышением холодопроизводительности контактного криоприбора, устанавливая в клинике для этих целей высокопроизводительные криорефрижераторы. На практике для лечения поверхностных образований кожи и слизистых оболочек, где объем разрушения невелик, область доступна для визуального наблюдения и не требуется сложных методов контроля, гораздо более удобны и не менее эффективны небольшие криоаппараты, к тому же они более простые в использовании и более дешевые.

Одно из преимуществ обсуждаемой методики локального криовоздействия — для деструкции выделенного участка нет необходимости вводить активный наконечник в объем ткани (непроникающие методы воздействия, как и в случае применения СВЧ-приборов). Для увеличения объема зоны некроза целесообразно использовать комбинированные методики, например, предварительное СВЧ-облучение плюс криовоздействие.

Другой путь — изменение методики замораживания и использование активных наконечников принципиально иной конструкции. Например, в объем ткани вводится криозонд, работающий на эффекте Калинина Э.К. (цит. по Потоцкому В.В.). Хладагент под повышенным давлением поступает в теплообменник по внутреннему капилляру — прямой поток. Обратный поток выводится наружу по трубке со

шнеком внутри, наружные холодные стенки внешней части криозонда контактируют непосредственно с замораживаемой тканью [13, 34].

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] Борхунова Е.Н. Особенности репаративной регенерации тканей после криодеструкции, СВЧ-криодеструкции и СВЧ-деструкции. Дис... д-ра биолог. наук. М., 2004, 328 с.
- [2] Габуда С.П., Ржавин А.Ф. ЯМР в кристаллогидратах и гидратированных белках. Новосибирск, 1978, 160 с.
- [3] Габуда С.П. Связанная вода. Факты и гипотезы. Новосибирск, 1982, с. 159.
- [4] Дерпгольц В.Ф. Мир воды. Л., 1979, с. 254.
- [5] Зянин С.В. Структурно-информационные представления о состоянии водной среды. *Вестник РАЕН*, 2010, № 3, с. 56–63.
- [6] Иванов К.П. Биоэнергетика и температурный гомеостазис. Л., 1972.
- [7] Колотилов Н.Н. Механизм криоповреждения и криопротекции биологических структур. Киев, 1976, с. 130–131.
- [8] Кондрашин Н.И., Сапелкина И.М. *Вопросы онкологии*, 1959, Т. 5, № 1, с. 83–89.
- [9] Лозина-Лозинский Л.И. Очерки по криобиологии. Адаптация и устойчивость организмов и клеток к низким и сверхнизким температурам. Л., 1972.
- [10] Мадиевский Ю. М. Структура внутриклеточной воды и ее роль в неспецифических реакциях тканей на внешнее воздействие. Томск, 1973.
- [11] Меламед В.Г. Количественные исследования тепло и массообмена в горных породах при протекании в них фазовых переходов. М., 1976.
- [12] Ноздрункова И.Р. Механо-химические процессы, происходящие в мясе при температурах, близких к криоскопическим. Л., 1966.
- [13] Потоцкий В., Маркин В. Вихри уносящие тепло, закономерности усиления теплоотдачи в каналах. *Наука в СССР*, 1982, № 6, с. 6–7.
- [14] Певзнер Л. Основы биоэнергетики: Пер. с англ. М., 1977, 100–112, 224–236 с.
- [15] Пушкарь Н.С., Белоус А.М. Введение в криобиологию. Киев, 1975.
- [16] Пушкарь Н.С. Актуальные проблемы криобиологии. Киев, 1981.
- [17] Розенталь О.М., Четин Ф.Е. Многослойное структурное упорядочивание в гетерогенных процессах льдообразования. Свердловск, 1974.
- [18] Самойлов О.Я. Структура водных растворов электролитов и гидратация ионов. М., 1957.
- [19] Слета И.В. Начальные изменения микроциркуляции печени крыс после локальных криовоздействий. *Криобиология*, 1986, № 2, с. 48.
- [20] Усольцева Н.В., Усольцева В.А. Жидкокристаллическое состояние и метаболизм. *Природа*, 1980, с. 56–62.
- [21] Чернух А.Н. Микроциркуляция. М., 1975.
- [22] Чистяков И.Г., Селезнев С.А. Биологическая роль литропных жидких кристаллов. *Природа*, 1977, № 9, с. 38–45.
- [23] Шафранов В.В. Некоторые проблемы и перспективы использования низких температур в детской хирургии. *Вестник АМН*, 1984, № 9, с. 12–19.
- [24] Шафранов В.В., Короткий Н.Г. Возможности использования метода СВЧ-криодеструкции в дермокосметологии для лечения келоидных рубцов. *Детская хирургия*, 2000, № 1, с. 35–37.
- [25] Эйзенберг Д., Кауцман В. Структура и свойства воды: Пер. с англ. Л., 1975.
- [26] Bald W., Fraser G. Cryogenic Surgeries. *Rep. Prog. Phys.*, 1982, v. 45, № 6, p. 1381–1433.

- [27] Fiocchi M. Validation of Freezing Protocol Understanding of Physical Mechanisms. Abstracts of 30<sup>th</sup> annual Meeting of the Society for Cryobiology: France, Marseill, 1999, p. 15.
- [28] Gage A. Cryosurgery. Paris, 1995, p. 142.
- [29] Van Venrjy G. Freeze-Etching: Freezing Velocity and Cristal Size at Different Size Locations in Samples. *Cryobiology*, 1975, v. 12, № 1, p. 46–61.
- [30] Mazur P. Physical-Chemical Factors Underlying Cell Injury in Cryosurgical Freezing. *Cryosurgery*. NY: Rand Ret, 1968, p. 32–35.
- [31] Mazur P. Cryobiology: the Freezing of Biogical System. *Science*, 1970, v. 168, p. 939–949.
- [32] Mazur P. The Role of Intracellular Freezing in the Death of Cells Cooled at Supraoptimal Rates. *Cryobiology*, 1977, v. 14, № 3, p. 251–272.
- [33] Shafranov V.V., Borkhunova E.N. Comparative Appreciation of Treatment of Angiomas by Cryogenic, MWI-Cryogenic and MVI Methods. *Cryomedicine Update*, Tokyo, Japan, 2006, p. 151–153.
- [34] Wan Retal. Afinit Element Model for Ice Ball Evolution in a Milti-Probe Cryosurgery. *Computer Metods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, 2003, v. 6, № 3, p. 197–208.

Статья поступила в редакцию 01.07.2013

Ссылку на эту статью просим оформлять следующим образом:

Шафранов В.В., Борхунова Е.Н., Цыганов Д.И., Торба А.И., Таганов А.В., Межов-Деглин Л.П., Калмыкова З.В., Подшивалова О.А. Современная концепция разрушения биологических тканей при локальной криодеструкции. *Гуманитарный вестник*, 2013, вып. 12. <http://hmbul.bmstu.ru/catalog/prmed/hidden/142.html>

**Шафранов Владимир Васильевич** — д-р мед. наук, профессор кафедры детской хирургии РНИМУ имени Н.И. Пирогова. Область научных интересов: здоровьесберегающие технологии, детская хирургия. e-mail: borhunova@mail.ru

**Борхунова Елена Николаевна** — д-р биол. наук, профессор кафедры анатомии и гистологии животных ФГБОУ ВПО МГАВМиБ имени К.И. Скрябина. Область научных интересов: здоровьесберегающие технологии, клинические исследования. e-mail: borhunova@mail.ru

**Цыганов Дмитрий Игоревич** — д-р техн. наук, первый заместитель руководителя Московского Комитета по науке и технологиям. Область научных интересов: применение криогенной техники в медицине для здоровьесберегающих технологий. e-mail: borhunova@mail.ru

**Торба Александр Иванович** — канд. биол. наук, ветеринарный менеджер компании Hill's. Область научных интересов: здоровьесберегающие технологии, клинические исследования. e-mail: borhunova@mail.ru

**Таганов Алексей Викторович** — д-р мед. наук, профессор кафедры дерматовенерологии Государственного института усовершенствования врачей Министерства обороны Российской Федерации. Область научных интересов: здоровьесберегающие технологии, клинические исследования. e-mail: borhunova@mail.ru

**Межов-Деглин Леонид Павлович** — д-р физ.-мат. наук, заведующий лабораторией в Институте физики твердого тела РАН. Область научных интересов: физика криомедицины и криобиологии в здоровьесберегающих технологиях. e-mail: borhunova@mail.ru

**Калмыкова Зинаида Васильевна** — заведующая криохирургическим отделением ГКБ № 60 г. Москвы. Область научных интересов: клиническое внедрение криомедицины в здоровьесберегающих технологиях. e-mail: borhunova@mail.ru

**Подшивалова Олеся Александровна** — аспирант кафедры детской хирургии РНИМУ им. Н.И. Пирогова. Область научных интересов: клинические исследования в криомедицине и здоровьесберегающих технологиях. e-mail: borhunova@mail.ru