

УДК 617-089: 57.086.13: 612.08

Н.А. Чиж<sup>1\*</sup>, И.В. Белозеров<sup>2</sup>, Д.Г. Асхабов<sup>2</sup>, Д.В. Комышанченко<sup>2</sup>,  
В.Ю. Глоба<sup>1</sup>, Л.Н. Марченко<sup>1</sup>, Ю.А. Чиж<sup>1</sup>

## Криохирургический метод деструкции *nervus vagus* в экспериментальных исследованиях

UDC 617-089: 57.086.13: 612.08

M.O. Chyzh<sup>1\*</sup>, I.V. Belozorov<sup>2</sup>, D.G. Aschabov<sup>2</sup>, D.V. Komyshanchenko<sup>2</sup>,  
V.Yu. Globa<sup>1</sup>, L.M. Marchenko<sup>1</sup>, Yu.O. Chyzh<sup>1</sup>

## Cryosurgical Method for *Nervus Vagus* Ablation in Experimental Studies

**Реферат:** При изучении влияния нервной системы на физиологические и патофизиологические процессы возникает необходимость определения вклада каждого из отделов вегетативной нервной системы. Для оценки влияния парасимпатического звена на вариабельность сердечного ритма разработан криохирургический метод деструкции *nervus vagus* в шейном отделе, в грудной и брюшной полостях. Показано, что на шеи в области «сонного» треугольника криохирургическим способом можно провести деструкцию *n. vagus*, а также криоденервацию *arteria carotis* и таким образом «выключить» из регуляторного звена расположенные на интима сосуда барорецепторы. Установлено, что с использованием эндоскопической установки и криохирургического способа денервации сосудов можно осуществить деструкцию барорецепторов дуги аорты с сохранением анатомической целостности сосуда. Относительная доступность выделения ветвей брюшного отдела *n. vagus* у крысы по латеральным краям пищевода позволяет провести криоденервацию как отдельных, так и обеих ветвей нерва вместе с пищеводом.

**Ключевые слова:** криодеструкция, *nervus vagus*, аорта, эксперимент, денервация, барорецепторы, эндоскопия.

**Реферат:** При вивченні впливу нервової системи на фізіологічні і патофізіологічні процеси виникає необхідність визначення вкладу кожного з відділів вегетативної нервової системи. Для оцінки впливу парасимпатичної ланки на варіабельність серцевого ритму розроблено криохірургічний метод деструкції *nervus vagus* у шийному відділі, в грудній і черевній порожнинах. Показано, що на шії у ділянці «сонного» трикутника криохірургічним способом можна провести деструкцію *n. vagus*, а також криоденервацию *arteria carotis* і таким чином «вимкнути» з регуляторної ланки розташовані на інтимі судини барорецептори. Встановлено, що з використанням ендоскопічної установки і криохірургічного способу денервації судин можна здійснити деструкцію барорецепторів дуги аорти зі збереженням анатомічної цілісності судини. Відносна доступність виділення гілок черевного відділу *n. vagus* у щура по латеральних краях стравоходу дозволяє провести криоденервацию як окремих, так і обох гілок нерва разом зі стравоходом.

**Ключові слова:** криодеструкція, *nervus vagus*, аорта, експеримент, денервація, барорецептори, ендоскопія.

**Abstract:** When studying the impact of nervous system on physiological and pathophysiological processes, a need arises to determine the contribution of each division of autonomic nervous system. For the *nervus vagus* ablation in cervical spine, chest and abdominal cavities the cryosurgical method has been designed to assess the effect of parasympathetic division on heart rate variability. There has been shown the possibility to implement the *n. vagus* ablation, as well as the *arteria carotis* cryodenervation using cryosurgical technique in the 'carotid' triangle area of the neck, and thereby to 'switch off' the vascular intima-located baroreceptors from a regulatory link. The use of endoscopic device and cryosurgical technique for vascular denervation was established to enable the aortic arch baroreceptor ablation while preserving an anatomical integrity of the vessel. Since the isolation procedure for the *n. vagus* abdominal branches in rat along the esophageal lateral edges is relatively accessible, it allows performing the cryodenervation of individual and both nerve branches along with esophagus.

**Key words:** cryoablation, *nervus vagus*, aorta, experiment, denervation, baroreceptors, endoscopy.

При изучении влияния на организм общей гипотермии и/или локальной криодеструкции важна оценка вклада вегетативной нервной системы (ВНС), функцией которой является регуляция физиологических процессов, обеспечиваю-

When studying the impact of whole-body hypothermia and / or local cryoablation on a body, it is important to assess the contribution of autonomic nervous system (ANS), whose function is to regulate the physiological processes, ensuring the body's

<sup>1</sup>Відділ експериментальної кріомедицини, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

<sup>2</sup>Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, м. Харків, Україна

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;  
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52  
електронна пошта: n.chizh@ukr.net

Надійшла 10.11.2018

Прийнята до друку 11.02.2020

<sup>1</sup>Department of Experimental Cryomedicine, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

<sup>2</sup>V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

\*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavka str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952  
e-mail: n.chizh@ukr.net

Received 10, November, 2018

Accepted 11, February, 2020

щих адаптацию организма к постоянно меняющимся условиям среды. Известно, что ВНС автономна, состоит из симпатического и парасимпатического отделов, которые участвуют в регуляции систем организма и обладают не только антагонистической, но и синергической направленностью [14]. Парасимпатический отдел ВНС представлен парой блуждающих нервов (*n. vagus* – X черепно-мозговая пара), которые анатомически подразделяются на головной, шейный, грудной и брюшной отделы [7, 8].

Для определения вклада каждого из отделов ВНС в регуляцию жизненно важных функций организма физиологи используют разные подходы: блокирование или стимуляцию нервов [15]. Первый подход заключается в пересечении нервов и/или их ветвей, что при проведении экспериментальных работ технически сложно, а в ряде случаев невозможно. В частности, это выделение нерва из сосудисто-нервного пучка или денервация артериальных сосудов с целью «выключения» барорецепторов, расположенных в стенке сосуда. При проведении такой манипуляции на аорте крыс сигналы, поступающие к центральным отделам ВНС, полностью не блокируются, что объясняется разветвленностью нервных волокон, идущих от барорецепторов к основному стволу *n. vagus* [6]. Полная блокада сигналов барорецепторов аорты важна для изучения механизмов регулирования частоты сердечных сокращений. Поэтому для исследования variability сердечного ритма (BCP) и правильной интерпретации частотных диапазонов спектрального анализа BCP необходима разработка высокотехнологичных способов «выключения» барорецепторов [9].

В этом аспекте одним из наиболее эффективных методов является криохирургический. В отличие от механического пересечения нервных волокон он позволяет проводить деструкцию тканей с сохранением эластически-коллагенового каркаса органа (сосуда, нерва) [1, 10]. После криодеструкции сосуда полностью разрушаются клетки интимы, мышечный и адвентициальный слои [10]. Следует отметить, что после криодеструкции повреждения носят обратимый характер. Нервные ткани восстанавливаются в течение нескольких месяцев [5, 13].

Цель работы – разработка методик денервации периферических отделов *n. vagus* криохирургическим способом.

### Материалы и методы

Эксперименты на животных проводили в соответствии с Законом Украины «О защите жи-

adaptation to constantly changing environmental conditions. It is known that the ANS is autonomous, consisting of sympathetic and parasympathetic branch, which participate in regulation of body's systems and have not only an antagonistic, but synergistic direction as well [7]. The parasympathetic division of ANS is represented by a pair of vagus nerves (*n. vagus* is the tenth cranial nerve pair), which are anatomically divided into the head, neck, thorax and abdomen compartments [13, 14].

In order to determine the contribution of each ANS division into regulation of body's vital functions, the physiologists use different approaches such as: nerve blocking or stimulation [12]. The first approach consists in the dissection of nerves and/or their branches. In the experiments, this procedure may be technically difficult and, in some cases, even impossible. There is, in particular, the nerve isolation from neurovascular bundle or arterial vessel denervation in order to 'switch off' the baroreceptors, located in vessel wall. When performing such a procedure in rat aorta, the signals coming to the ANS central parts are not totally blocked, that is explained by the branching of nerve fibers coming from baroreceptors to the *n. vagus* main trunk [11]. A total blockade of signals from aortic baroreceptors is decisive when studying the mechanisms of heart rate regulation. Therefore, to study the heart rate variability (HRV) and to interpret correctly the frequency ranges of HRV spectral analysis, it is necessary to design the breakthrough technologies for baroreceptor 'switching off' [3].

In this aspect, one of the most efficient ways is cryosurgical. In contrast to mechanical dissection of nerve fibers, it destroys the tissue while preserving the elastic-collagen scaffold of organ (vessel, nerve) [1, 5]. After vessel cryoablation, the intima cells, muscle and adventitious layers are completely destroyed [5]. Of note is a reversible character of post cryoablation lesions. The nerve tissues may restore within a few months [2, 10].

The research aim was to design the denervation methods for *n. vagus* peripheral compartments using cryosurgical way.

### Materials and methods

The experiments in animals were carried out in accordance with the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals Against Cruelty' (No. 3447–IV of February 21.2006), in compliance with the requirements of the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of

вотных от жестокого обращения» (№3447–IV от 21.02.2006) при соблюдении требований Комитета по биоэтике ИПКиК НАН Украины, согласованных с положениями «Европейской Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1986).

Работу выполняли на 7-месячных крысах-самцах ( $n = 30$ ) линии Вистар массой 200–300 г в стационарных условиях вивария в утреннее время (с 9 до 12 ч).

Оперативные вмешательства проводили под ингаляционным наркозом. Для дополнительного обезболивания однократно внутримышечно вводили «Налбуфин» («Здоровье», Украина) в дозе 1 мг/кг.

Для криодеструкции *n. vagus* использовали автономный дерматологический криоинструмент КД-3 (ФТИНТ НАН Украины, г. Харьков) [2, 3] и специально изготовленный медный аппликатор в виде незамкнутой на 2/3 окружности при температуре рабочей поверхности  $-120^{\circ}\text{C}$ . Общее время проведения манипуляции составляло 60 с [10].

Оперативные вмешательства на грудной полости выполняли с помощью эндоскопической установки, разработанной в отделе экспериментальной криомедицины ИПКиК НАН Украины [11,12].

После выведения животного из эксперимента проводили морфологический анализ эндотелия фрагмента аорты на уровне ее дуги. Полутонкие срезы получали на ультрамикротоме УМТП-7 («Электрон», Украина), окрашивали полихромным красителем на основе метиленового синего и основного фуксина, исследовали на микроскопе «Granum R 4003» («Granum», Китай), снабженном цифровой видеокамерой «Panasonic WV-CP 470» («Panasonic», Япония). Ультратонкие срезы контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и раствором цитрата свинца по Рейнольдсу. Для изготовления препаратов фрагменты аорты после префиксации и сепарирования адвентиции импрегнировали азотнокислым серебром по стандартной методике [4]. Препараты аорты заключали в глицерин-желатиновую смесь и изучали в проходящем свете под световым тринокулярным микроскопом «Granum R 4003» («Granum»), используя камеру «DCM 510» («eTrek», Китай).

## Результаты и обсуждение

*Методика криодеструкции n. vagus в шейном отделе.* Животных фиксировали к операционному столу в положении «лежа на спине». После удаления шерстного покрова в асептических

Украине, agreed to the statements of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

The work was performed in 7-month-old Wistar male rats ( $n = 30$ ), weighing 200–300 g under usual animal housing in the morning (from 9 to 12 a. m.).

The surgery was done with inhalation anesthesia. For additional anesthesia, Nalbuphine (Zdorovye, Ukraine) at a dose of 1 mg / kg was once administered, intramuscularly.

For *n. vagus* cryoablation we used the self-contained dermatological cryogenic instrument KD-3 (B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv) [8, 16] and the specially manufactured 1/3 open circle-shaped copper applicator with operating surface temperature of  $120^{\circ}\text{C}$ . Total time of manipulation was 60 s [5].

The surgeries in thoracic cavity were done using the endoscopic device, designed at the Department of Experimental Cryomedicine of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine [4, 6].

After animal sacrificing, the fragment of aortic endothelium at its arch level was morphologically analyzed. The semi-thin sections were obtained with UMTP-7 ultramicrotome (Elektron, Ukraine), stained with the methylene blue and basic fuchsin-based polychrome dye, then analysed with Granum R 4003 microscope (Granum, China), equipped with Panasonic WV-CP 470 digital video camera (Panasonic, Japan). The ultrathin sections were contrasted with a saturated aqueous solution of uranyl acetate and lead citrate solution according to Reynolds. To make the preparations, the aortic fragments after prefixation and adventitia separation were impregnated with silver nitrate according to the standard method [9]. Aortic preparations were embedded into a glycerol-gelatin mixture and studied in transmitted light with light trinocular microscope Granum R 4003 (Granum) using DCM 510 camera (eTrek, China).

## Results and discussion

*Cryoablation method for cervical n. vagus.* The animals were fixed in a supine position to the operating table. An anterior midline neck incision was made at thyroid cartilage level and below after hair coat removal, under aseptic conditions. Surgical wound was formed by separating apart the skin edges and subcutaneous fat layer, then fixed with Mikulich clamps. A neurovascular bundle was isolated in the 'carotid' triangle between



условиях выполняли передний срединный разрез шеи на уровне и ниже щитовидного хряща. Операционную рану формировали разведением в стороны краев кожи и подкожно-жирового слоя, которые фиксировали зажимами Микулича. В «сонном» треугольнике между верхним брюшком *musculus omohyoideus* и передним краем *musculus sternocleidomastoideus* выделяли сосудисто-нервный пучок (рис. 1, А). Блуждающий нерв, внутренняя яремная вена и общая сонная артерия расположены в общем соединительно-тканном влагалище [6].

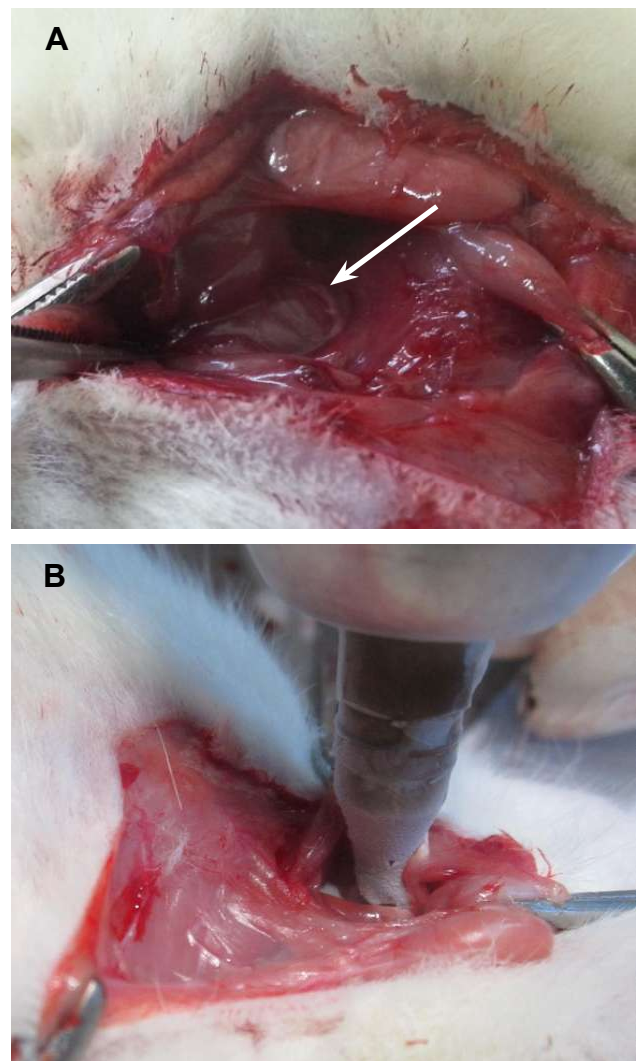
Из сосудисто-нервного пучка выделяли *n. vagus* и проводили его локальную криодеструкцию (рис. 1, В), не повреждая окружающие ткани. Операционную рану после тщательного гемостаза послойно ушивали.

В зависимости от поставленных задач проводили одно- или двухстороннюю ваготомию шейного отдела. При этом криохирургическим способом можно выполнять денервацию *arteria carotis* и «выключать» из регуляторного звена расположенные на интима сосуда барорецепторы, передающие сигналы по языкоглоточному нерву в продолговатый мозг, в котором расположены центры симпатического отдела ВНС.

*Методика криодеструкции n. vagus в грудном отделе.* При разработке методики криодеструкции *n. vagus* в грудном отделе мы проводили криоденервацию дуги аорты с целью «выключения» барорецепторов дуги аорты. Известно, что левый блуждающий нерв (при входе в грудную полость) располагается на передней поверхности дуги аорты, а правый – на передней поверхности начального отдела правой подключичной артерии [6].

После наркотизации и фиксации животного к операционному столу в асептических условиях производили кожный разрез в зоне правого и левого II межреберья. Большую и малую грудные мышцы разводили в стороны.

Для точной верификации восходящего отдела и дуги аорты использовали эндоскопический метод [11, 12]. Риноскоп 0° диаметром 2,7 мм («MGB», Германия) вводили через троакар (диаметр 3,0 мм) во II межреберье слева. Предварительно накладывали два провизорных W-образных шва с захватом II и III ребер и фиксацией нитей. Данный прием позволяет после завершения криодеструкции быстро закрыть рану и предотвратить развитие открытого пневмоторакса, поскольку операцию проводили в условиях спонтанного дыхания без использования аппарата искусственной вентиляции легких.



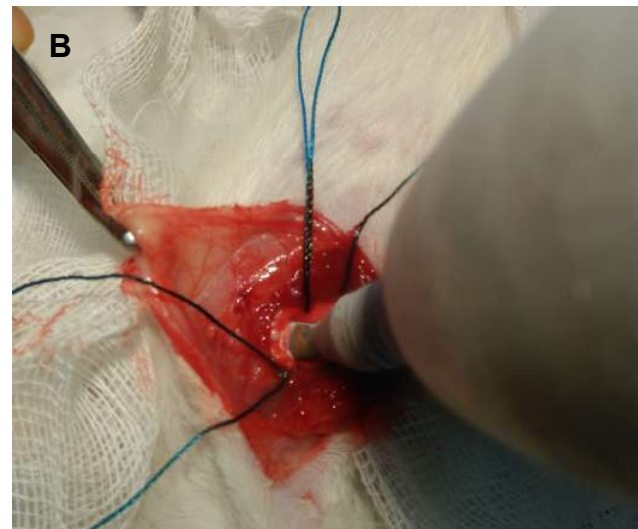
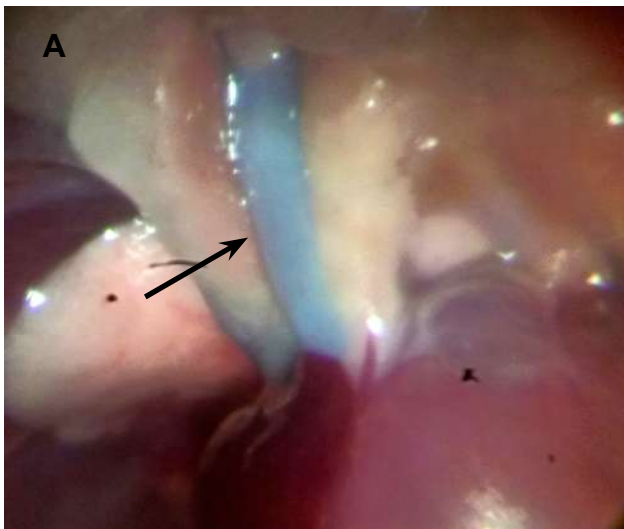
**Рис. 1.** Криодеструкция *n. vagus* шейного отдела крысы. **А** – оперативный доступ к сосудисто-нервному пучку в «сонном» треугольнике справа. Стрелкой обозначен *n. vagus*; **В** – криодеструкция *n. vagus*.

**Fig. 1.** *N. vagus* cryoablation in rat's cervical region. **A** – cutdown approach to neurovascular bundle in 'carotid' triangle on the right. The arrow indicates the *n. vagus*; **B** – the *n. vagus* cryoablation.

the superior belly of *musculus omohyoideus* and an anterior edge of *musculus sternocleidomastoideus* (Fig. 1A). The vagus nerve, internal jugular vein and common carotid artery are located in the common connective tissue sheath [11].

The *n. vagus* was isolated from the neurovascular bundle and its local cryoablation was carried-out (Fig. 1B) without damaging the surrounding tissues. After careful hemostasis, the surgical wound was sutured in layers.

Depending on the tasks set, the one- or two-sided cervical vagotomy was performed. This cryosurgical method provides denervation of the *arteria carotis* and 'switching off' from a regulatory link of the vascular intima-located baroreceptors, transmitting



**Рис. 2.** Криодеструкция дуги аорты крысы. **А** – расположение аорты в грудной полости (торакоскопия, стрелкой указан восходящий отдел аорты); **В** – криоденервация дуги аорты.

**Fig. 2.** Cryoablation of rat aortic arch. **A** – aorta location in chest cavity (thoracoscopy, the arrow indicates the ascending aorta); **B** – aortic arch cryodenerivation.

В правой половине грудной полости с помощью троакара (диаметр 5,0 мм) в зону II межреберья вводили эндоскопический зажим, вскрывали перикард в области основания сердца и мобилизовали аорту (рис. 2, А).

Удалив зажим и троакар, вводили криоинструмент КД-3. Правосторонняя торакотомия во II межреберья обеспечивает оптимальный доступ к дуге аорты. Применение специальной насадки в качестве криоапликатора позволяет обхватить дугу аорты и провести криодеструкцию сосуда в полном объеме до прекращения кровотока (рис. 2, В).

Участок аорты после криовоздействия и извлечения инструмента оттаивал в течение 5–7 с, и кровоток в аорте восстанавливался. Затем риноскоп извлекали из грудной полости. После гемостаза W-образные швы с обеих сторон затягивали и послойно ушивали послеоперационную рану.

Световая микроскопия полутонких срезов аорты показала, что в норме структура всех слоев исследуемого сосуда сохранена. Определялось четкое разграничение по слоям (рис. 3, А).

Адвентициальная оболочка была представлена коллагеновыми волокнами, фибробластами и жировыми клетками, а также пучками нервных волокон, идущих вдоль сосуда и перекрещивающихся между собой. Клетки эндотелия на полутонких срезах не определялись. Внутренняя эластическая мембрана четко выражена, ее связь с мышечным слоем сохранена.

После криоденервации нервные волокна адвентициальной оболочки претерпели значитель-

the signals along the glossopharyngeal nerve to the medulla oblongata, where the sympathetic ANS centers are situated.

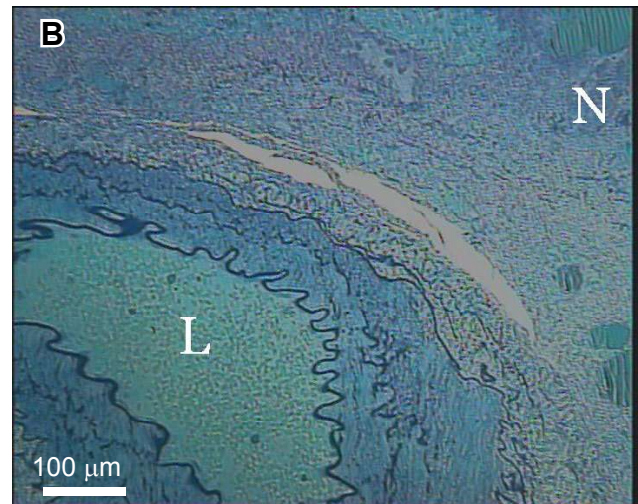
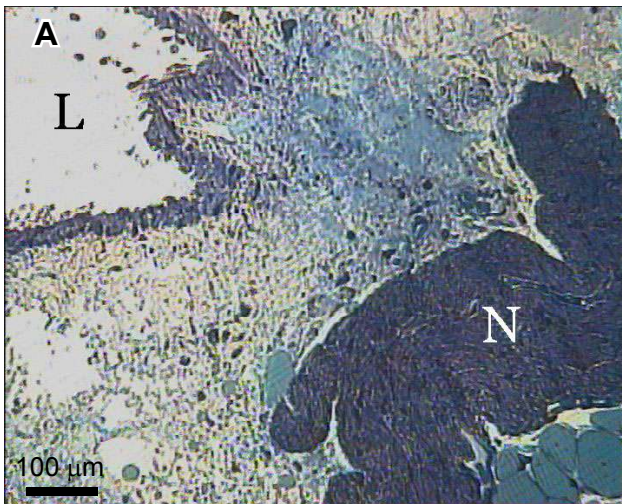
*Cryoablation technique for thoracic n. vagus.* When designing the technique for thoracic *n. vagus* cryoablation the aortic arch was cryodenerivated to ‘switch off’ the aortic arch baroreceptors. The left vagus nerve, when entering the chest cavity, is known to be located on an anterior surface of the aortic arch, and the right one is found on an anterior surface of the initial section of the right subclavian artery [11].

After animal anesthetizing and fixing to the operating table, a skin was incised under aseptic conditions in the area of the right and left II intercostal spaces. The pectoralis major and minor were separated apart.

The endoscopic method was used for precise verification of the ascending aorta and aortic arch [4, 6]. The 0° rhinoscope with 2.7 mm diameter (MGB, Germany) was inserted through a trocar (3.0 mm diameter) into the II intercostal space on the left. Two provisional W-shaped sutures were preliminarily laid with capturing the ribs II and III and suture fixation. This technique helps to close wound rapidly and to prevent an open pneumothorax development after cryoablation completing, since the surgery was carried-out under spontaneous breathing with no apparatus for artificial lung ventilation.

An endoscopic clamp was inserted into the 2<sup>nd</sup> intercostal space in the right chest cavity, using a trocar (diameter 5.0 mm), the pericardium was





**Рис. 3.** Фрагмент стенки дуги аорты крысы: **А** – норма; **В** – после криоденервации. Полутонкий срез. Окрашивание метиленовым и толуидиновым синим (N – нервные волокна, L – просвет артерии). Световая микроскопия.

**Fig. 3.** Rat's aortic arch wall fragment: **A** – the norm; **B** – after cryodestruction. Semi-thin section. Staining with methylene and toluidine blue (N – nerve fibers, L – lumen of artery). Light microscopy.

ные деструктивные изменения, приводящие к разрушению клеточных элементов (рис. 3, B), большинство из которых были фрагментированы и имели вид размытых по поверхности очагов. Определялись кровоизлияния из мелких кровеносных сосудов адвентиции вследствие нарушения целостности их сосудистой стенки, что свидетельствовало о разрушении нервных окончаний, в том числе и барорецепторов [16]. В мышечной оболочке каркас из эластических и коллагеновых волокон сохранялся, однако наблюдались их разрыхление и дезориентация.

Для верификации наличия или отсутствия эндотелия сосуда после криодеструкции аорты изучали морфологическую структуру интимы, импрегнируя гистологические препараты серебром. Данный метод позволяет определить структуру клеток и тканей, поскольку они обладают разной способностью удерживать или восстнавливать соли серебра.

Проведенный морфологический анализ сегмента дуги аорты показал, что в норме ее интима представлена эндотелиальной выстилкой. В препаратах аорты, импрегнированной серебром, эндотелиальные клетки имели форму многоугольников с четкими равномерными аргирофильными контурами, вытянутыми вдоль оси сосуда (рис. 4, A).

После криодеструкции структурная организация эндотелия аорты, как наиболее криолабильной ткани, претерпела существенные изменения, приводящие к его слущиванию. На препаратах обнаружены обширные участки десквамации эндотелия (рис. 4, B).

opened at the base of the heart and aorta was mobilized (Fig. 2A).

After the clamp and trocar removing, the KD-3 cryoinstrument was introduced. A right-sided thoracotomy in the 2<sup>nd</sup> intercostal space ensures an optimal access to aortic arch. Using a special tip as a cryoapplicator we can grasp an aortic arch and perform a total vessel cryoablation until the blood flow stops (Fig. 2B).

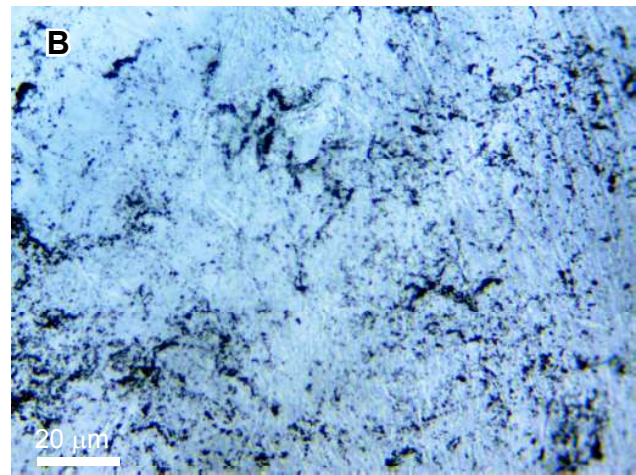
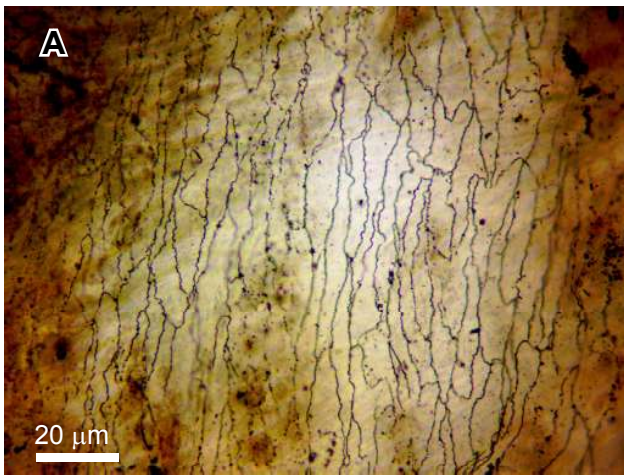
After cryoexposure and instrument removal the aortic site was thawed for 5–7 s and blood flow in aorta was restored. The rhinoscope was then removed from thoracic cavity. After hemostasis, the W-shaped sutures on both sides were tightened and the post-surgery wound was sutured in layers.

Light microscopy of semi-thin sections of the aorta in the norm showed the structure of all the layers in the studied vessel to be preserved. A sharp distinction by layers was seen (Fig. 3A).

An adventitial membrane was represented by collagen fibers, fibroblasts and fat cells, as well as the nerve fiber bundles, running along the vessel and crossing each other. No endothelial cells were detected in semi-thin sections. The inner elastic membrane was distinct, its connection with the muscle layer was preserved.

After cryodestruction, the nerve fibers of adventitial membrane underwent significant destructive changes, resulting in cell element disintegration (Fig. 3C), most of which were fragmented and looked like the surface-blurred foci. There were found the hemorrhages from adventitial small blood vessels due to a disordered integrity of their vascular wall, that testified to the destruction





**Рис. 4.** Фрагмент стенки дуги аорты крысы. **А** – эндотелий аорты интактной крысы; **В** – эндотелий аорты после криовоздействия. Импрегнация серебром. Световая микроскопия.

**Fig. 4.** Rat's aortic arch wall fragment. **A** – aortic endothelium of intact rat; **B** – aortic endothelium after cryoexposure. Silver impregnation. Light microscopy.

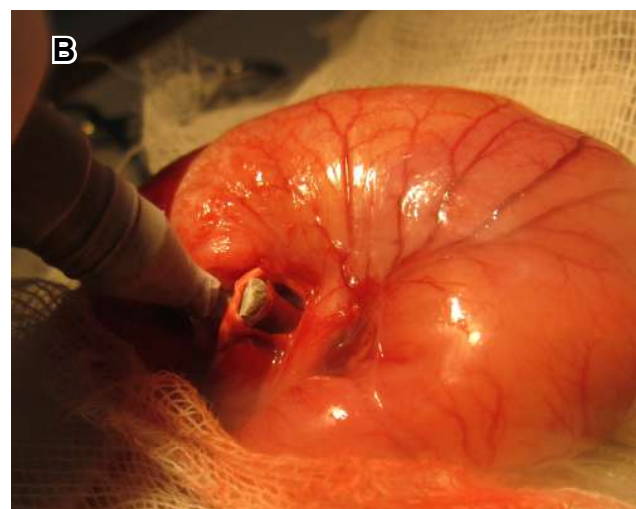
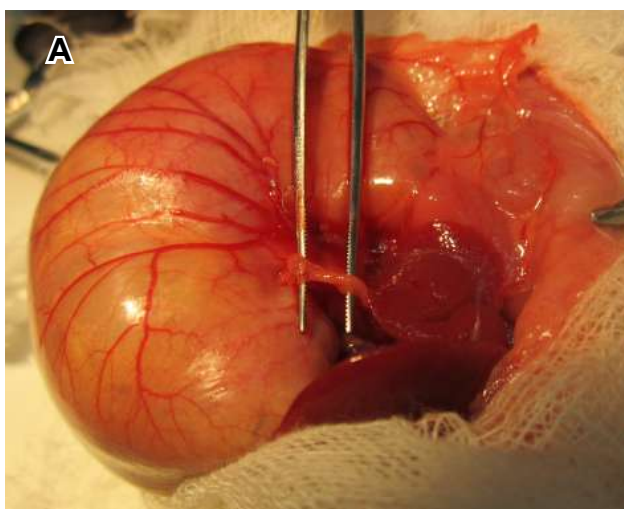
Результаты проведенных ранее исследований на *arteria hepatica* [10], так и наших экспериментов показали, что температура  $-120^{\circ}\text{C}$  и экспозиция 60 с обеспечивают криодеструкцию как интимы, так и адвентиции сосуда.

*Методика криодеструкции n. vagus в брюшном отделе.* Для наркотизации и фиксации животных применяли вышеописанные методики. После удаления шерстного покрова в асептических условиях вскрывали переднюю брюшную стенку. В операционную рану выводили брюшной отдел пищевода и желудок. По обе стороны кардиального отдела пищевода четко определялись ветви *n. vagus* (рис. 5, А). Далее

of nerve endings, including baroreceptors [15]. In muscular membrane, the scaffold of elastic and collagen fibers was preserved, but their loosening and disorientation were noted.

To verify the presence or absence of vessel endothelium after aorta cryoablation, the intima morphology was studied using the silver impregnation of histological preparations. This method enables determining the structure of cells and tissues, since they have different capability to retain or restore the silver salts.

The performed morphological analysis of the aortic arch segment under normal conditions showed its intima to be represented by endothelial lining. In the silver-impregnated aortic preparations



**Рис. 5.** Криодеструкция брюшного отдела *n. vagus*: **А** – выделение правой ветви брюшного отдела *n. vagus*; **В** – криодеструкция передней ветви *n. vagus*.

**Fig. 5.** Cryoablation of *n. vagus* abdominal portion: **A** – isolation of right branch of *n. vagus* abdominal portion; **B** is cryoablation of *n. vagus* anterior branch.



с помощью криоинструмента проводили криодеструкцию передней ветви *n. vagus* (рис. 5, В).

После тщательного гемостаза послойно ушивали переднюю брюшную стенку и накладывали кожные швы на рану. В послеоперационном периоде осложнений, изменений в поведении и приеме пищи, а также случаев послеоперационной летальности зафиксировано не было.

Криохирургический метод деструкции нервов открывает новые возможности для исследований физиологических механизмов variability сердечного ритма, а также при проведении операций, предусматривающих криоденервацию сердца: ветвей симпатического и парасимпатического нервов, а также синусового узла правого предсердия.

### Выводы

Установлено, что криохирургический метод позволяет проводить деструкцию *n. vagus* в различных анатомических областях экспериментальных животных и исключить влияние парасимпатического отдела ВНС на variability сердечного ритма.

Используя предложенный оперативный доступ в грудную полость животных с помощью эндоскопической установки и криохирургического метода денервации сосудов, можно осуществить деструкцию барорецепторов дуги аорты с сохранением анатомической целостности сосуда.

Относительная доступность выделения ветвей брюшного отдела *n. vagus* по латеральным краям пищевода крысы позволяет проводить криоденервацию как отдельных, так и обеих ветвей нерва вместе с пищеводом.

*Работа выполнена в рамках ведомственной научно-исследовательской работы Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины «Деструктивні та відновні процеси в тканинах in vivo після дії низьких температур та біологічно активних речовин» (державний реєстраційний номер 0117U000849).*

### Литература

1. Бойко ВВ, Хворостов ЕД, Сушков СВ. Криоваготомия в комплексном лечении больных хроническими дуоденальными язвами. Вісник Харківського національного університету. Серія Медицина. 2004; (614): 30–3.
2. Веркин БИ, Медведев ЕМ, Муринец-Маркевич БН, Утемов ТВ. изобретатели; Физико-технический институт низких температур Украинской ССР, патентообладатель. Устройство для локального охлаждения ткани. Авторское свидетельство № 528090. 15.09.1976.

the endothelial cells were polygon-shaped with distinct uniform argyrophilic contours elongated along the vessel axis (Fig. 4A).

After cryoablation, a structural organization of aortic endothelium, as the most cryolabile tissue, underwent significant changes, entailing its desquamation. The preparations revealed the extensive sites of endothelium desquamation (Fig. 4B).

Previous findings in *arteria hepatica* [5], as well as our own findings showed the temperature of  $-120^{\circ}\text{C}$  and 60 s exposure to provide the cryoablation of both vascular intima and adventitia.

*Cryoablation technique for abdominal n. vagus.* For animal anesthesia and fixation we used the described above techniques. After hair coat removal, an anterior abdominal wall was opened under aseptic conditions. An abdominal portion of esophagus and stomach were brought into surgical wound. The *n. vagus* branches were clearly determined on both sides of cardiac portion of the esophagus (Fig. 5A). Further, using cryoinstrument, the cryoablation of *n. vagus* anterior branch was performed (Fig. 5B).

After careful hemostasis, an anterior abdominal wall was sutured in layers and the skin sutures were laid to the wound. In a post-surgery period, no complications, changes in behavior and food intake, neither cases of post-surgery mortality were recorded.

This approach is crucial in studying the physiological mechanisms of heart rate variability, because of its prospects for surgeries, involving the heart cryodenervation, *i. e.* branches of sympathetic and parasympathetic nerves, as well as right atrial sinus node.

### Conclusions

Cryosurgical method was established to enable the *n. vagus* ablation in various anatomical areas in experimental animals and allows excluding the impact of ANS parasympathetic branch on heart rate variability.

Using the proposed surgical approach to animal chest cavity by means of endoscopic device and a cryosurgical way for vascular denervation, the aortic arch baroreceptors may be destroyed while preserving the anatomical integrity of the vessel.

A relative accessibility of isolation of the *n. vagus* abdominal branches along the lateral edges of rat esophagus enables the cryodenervation of individual and both nerve branches along with esophagus.

*The work has been carried out within the scope of the Departmental Scientific Research of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National*





3. Грищенко ВИ, Сандомирский БП. Практическая криомедицина. Киев: Здоров'я; 1987. 246 с.
4. Кондаков ИК, Яковцова АФ, Гавриш АС. Способи оцінки морфофункціонального стану ендотелію судин. Методичні рекомендації. Харків, Київ; 2000. 19 с.
5. Мирошникова МЕ, Чумасов ЕИ. Регенерация седалищного нерва крысы после его различных экспериментальных повреждений. Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. 1988; 95(10): 30–5.
6. Ноздрачев АД, Поляков ЕЛ. Анатомия крысы (Лабораторные животные). Санкт-Петербург: Лань; 2001. 464 с.
7. Синельников РД. Атлас анатомии человека. Москва: Медицина; 1987. Т. 2. 558 с.
8. Сыровнев ВА, Лебедев ДС, Михайлов ЕН. Стимуляция блуждающего нерва в кардиологии. Трансляционная медицина. 2017; 4(2): 6–16.
9. Чиж НА. Параметры спектрального анализа вариабельности сердечного ритма у крыс. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2015; 25(3): 235–45.
10. Чиж НА, Марченко ЛН, Белочкина ИВ, и др. Ультраструктура печеночной артерии после криоденервации. Український морфологічний альманах. 2008; 6(3): 84–7.
11. Чиж МО, Белочкина ИВ. винахідники; Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб денервації барорецепторів дуги аорти в експерименті. Патент України № 135663. 10.07.2019.
12. Чиж МО, Бизов ДВ, Антоненко СО, та ін. Ендоскопічна установка для операцій на експериментальних тваринах. Фізіологічний журнал. 2017; 63(2): 86–94.
13. Bozkurt A, Tholl S, Wehner S, et al. Evaluation of functional nerve recovery with Visual-SSI – A novel computerized approach for the assessment of the static sciatic index (SSI). J Neurosci Meth. 2008; 170(1): 117–22.
14. Inoue H, Zipes DP. Changes in atrial and ventricular refractoriness and in atrioventricular nodal conduction produced by combinations of vagal and sympathetic stimulation that result in a constant spontaneous sinus cycle length. Circulation research. 1987; 60(6): 942–51.
15. Schmidt RF, Thews G. Human physiology. Berlin: Springer-Verlag; 1989. 825 p.
16. Taha M. Effects of denervation on baroreceptor and chemoreceptor endings in the aorta and pulmonary trunk of the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*). J Anat. 1987; 150: 49–60.

*Academy of Sciences of Ukraine entitled as 'Destructive and Restorative In Vivo Processes in Tissues after Impact of Low Temperatures and Biologically Active Substances', State registration № 0117U000849.*

## References

1. Boyko VV, Khvorostov ED, Sushkov SV. [Cryovagotomy in patient with duodenal peptic ulcer]. The Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University. Series Medicine. 2004; (614): 30–3. Russian.
2. Bozkurt A, Tholl S, Wehner S, et al. Evaluation of functional nerve recovery with Visual-SSI – A novel computerized approach for the assessment of the static sciatic index (SSI). J Neurosci Meth. 2008; 170(1): 117–22.
3. Chizh NA. Parameters of spectral analysis of heart rate variability in rats. Probl Cryobiol Cryomed. 2015; 25(3): 235–45.
4. Chizh NA, Byzov DV, Antonenko YeA, et al. [Endoscopic device for surgeries in experimental animals]. Fiziol Zh. 2017; 63(2): 86–94. Ukrainian.
5. Chizh NA, Marchenko LN, Belochkina IV, et al. [Ultrastructure of hepatic artery after cryodenervation]. Ukr Morfol Almanakh. 2008; 6(3): 84–7. Russian.
6. Chizh MO, Belochkina IV, inventors; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, assignee. [Method of denervation of the baroreceptor of the aortic arch in experiment]. Ukraine patent N 135663, 2019 July 10. Ukrainian.
7. Inoue H, Zipes DP. Changes in atrial and ventricular refractoriness and in atrioventricular nodal conduction produced by combinations of vagal and sympathetic stimulation that result in a constant spontaneous sinus cycle length. Circulation Research. 1987; 60(6): 942–51.
8. Grisichenko VI, Sandomirskiy BP. [Practical cryomedicine]. Kyiv: Zdorov'ya; 1987. 246 p. Russian.
9. Kondakov IK, Yakovtsova AF, Gavriash AS. [Ways to estimate the morphofunctional state of vascular endothelium]. Methodical recommendations. Kharkiv, Kyiv; 2000. 19 p. Russian.
10. Miroshnikova ME, Chumasov EI. [Regeneration of the sciatic nerve of the rat after its various experimental injuries]. Archive of Anatomy, Histology and Embryology. 1988; 95(10): 30–5. Russian.
11. Nozdrachev AD, Polyakov EL. [Anatomy of rat (Laboratory animals)]. Saint Petersburg: Lan', 2001. 464 p. Russian.
12. Schmidt RF, Thews G. Human physiology. Berlin: Springer-Verlag; 1989. 825 p.
13. Sinelnikov RD. [Atlas of human anatomy]. Moscow: Meditsina; 1987. V.2. 558 p. Russian.
14. Syrovnev VA, Lebedev DS, Mikhaylov EN. [Vagus nerve stimulation in cardiology]. Translational Medicine. 2017; 4(2): 6–16. Russian.
15. Taha M. Effects of denervation on baroreceptor and chemoreceptor endings in the aorta and pulmonary trunk of the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*). J Anat. 1987; 150: 49–60.
16. Verkin BI, Medvedev EM, Murinec-Markevich BM, Utemov TV, inventors; Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine, assignee. [Device for local tissue cooling]. USSR C.A. (certificate of authorship) № 528090. 1976 Sept. 15. Russian.

