

УДК 617-089:57.086.13]:616.441-008.61

К.О. Побеленський<sup>1\*</sup>, О.В. Пахомов<sup>1,3</sup>, Т.М. Гуріна<sup>2</sup>,  
Л.А. Побеленська<sup>1,3</sup>, Є.І. Легач<sup>1</sup>, Г.А. Божок<sup>1,3</sup>

## Експериментальна кріодеструкція щитовидної залози з пропілтіоурацил-індукованою дифузною гіперплазією

UDC 617-089:57.086.13]:616.441-008.61

К.О. Pobielienskyi<sup>1\*</sup>, O.V. Pakhomov<sup>1,3</sup>, T.M. Gurina<sup>2</sup>,  
L.A. Pobielienska<sup>1,3</sup>, Ie.I. Legach<sup>1</sup>, G.A. Bozhok<sup>1,3</sup>

## Experimental Cryoablation of Thyroid Gland with Propylthiouracyl-Induced Diffuse Hyperplasiae

**Реферат:** Кріодеструкція під контролем ендоскопічної техніки вважається перспективним підходом до лікування доброякісних вузлових утворень щитовидної залози (ЩЗ). Для визначення параметрів кріодеструкції необхідне проведення модельних експериментів на тваринах, оскільки патологічно змінена тканина ЩЗ відрізняється за теплопровідністю та теплоємністю від нормальної тканини. У роботі порівнювали температурні зміни в ЩЗ експериментальних тварин під час кріовпливу на нормальну тканину та з дифузною гіперплазією (ДГ), індукованою пропілтіоурацилом (ПТУ). Кріодеструкцію ЩЗ проводили щурам, які до цього втручання отримували 0,1%-й розчин ПТУ протягом 90 днів. Використовували мідний кріоаплікатор, охолоджений до температури рідкого азоту. Процес контролювали за допомогою термопар, розташованих на різній відстані від зони проморожування. Встановлено відмінності між термограмами зразків інтактної тканини ЩЗ та ПТУ-індукованої ДГ. Доведено, що для руйнування тканини ЩЗ із ДГ на глибину більше 1 мм необхідно проводити два цикли заморожування-нагріву з 120-секундною експозицією кріоаплікатора.

**Ключові слова:** щитовидна залоза, кріодеструкція, пропілтіоурацил, дифузна гіперплазія, щури.

**Abstract:** Cryoablation under endoscopic control is considered to be a promising approach in therapy of benign nodules of thyroid gland (TG). However, pathologically altered TG tissue differs in thermal conductivity and heat capacity from normal one, therefore the model experiments in animals are necessary to determine the cryoablation parameters. In this research, the changes of temperature during cryoablation of experimental rat TG under normal conditions and the one with propylthiouracyl (PTU)-induced diffuse hyperplasia (DH) were comparatively assessed. TG was cryoablated in rats, previously received a 0.1% PTU solution within 90 days, using a copper cryoprobe, cooled to liquid nitrogen temperature. The process was controlled using thermocouples placed at different distances from the iceball. Differences between thermograms of intact TG tissue and the samples with PTU-induced DH were established. To achieve the destruction effect of TG with DH to a depth of more than 1 mm, the need of implementing two freeze-thaw cycles with 120-second cryoprobe exposure was proven.

**Key words:** thyroid gland, cryoablation, propylthiouracyl, diffuse hyperplasia, rats.

Доброякісні вузлові утворення (ДВУ) щитовидної залози (ЩЗ) діагностуються за допомогою УЗД у 10–40% населення [1]. У більшості випадків вони не потребують лікування, але деяким пацієнтам показана хірургічна операція з індивідуальних або косметологічних причин. Після хірургічного втручання існує ризик виникнення ускладнень (гіпотиреоз, гіпопаратиреоз, пошкодження гортанного нерва) у 2–10% пацієнтів [7]. З огляду на вищевикладене, актуальною є розробка малоінвазивних хірургічних методів лікування ДВУ ЩЗ.

Останнім часом хімічна або термічна деструкція вузлових утворень ЩЗ широко застосовується

Currently, the benign nodules (BN) of thyroid gland (TG) are diagnosed among 10–40% of population using ultrasonography [1]. In most cases, they can be left untreated, but some patients need a surgical treatment by individual or cosmetic reasons. After surgery, 2–10% of patients may have certain complications (hypothyroidism, hypoparathyroidism, laryngeal nerve damage) [2]. Based on the mentioned above, of current interest was to design the minimally invasive surgical treatments for TG BN.

Recently, chemical or thermal ablation of TG nodules has been widely applied as a minimally invasive procedure. The development of endoscopic

<sup>1</sup> Відділ кріоендокринології;

<sup>2</sup> Відділ кріомікробіології, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна

<sup>3</sup> Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Харків, Україна

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;  
тел.: (+38 057) 373-41-43, факс: (+38 057) 373-59-52  
електронна пошта: Pobelensky@gmail.com

Надійшла 19.02.2020

Прийнята до друку 20.04.2021

<sup>1</sup> Department of Cryoendocrinology,

<sup>2</sup> Department of Cryomicrobiology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

<sup>3</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 4143, fax: +380 57 373 5952  
e-mail: Pobelensky@gmail.com

Received 19, February, 2020

Accepted 20, April, 2021

як метод малоінвазивного втручання. Розвиток ендоскопічної техніки дає можливість проводити подібні операції під візуальним контролем. На теперішній час доведено ефективність черезшкірної етанолової деструкції («етанолової склеротерапії») кістозних утворень ЩЗ [23]. Лазерну, радіочастотну і мікрохвильову деструкцію використовують для лікування ДВУ ЩЗ у тому випадку, якщо протипоказано хірургічне втручання [12, 16, 24].

Кріодеструкція менш розповсюджена у клінічній практиці, проте в терапії ДВУ ЩЗ показана її перспективність [5, 13]. Перевагами даного методу є низька собівартість, малоінвазивність, низький ризик кровотечі, мінімізація анестезії (оскільки заморожування має знеболюючу дію), «кріоімунологічний» ефект, скорочення часу операції та післяопераційного періоду, високий косметичний ефект [6, 9, 21].

Основними принципами сучасної кріохірургії є швидке охолодження тканини, повільне її відтавання і багаторазовість циклів заморожування-нагрівання [10]. При реалізації кріодеструкції необхідно враховувати залежність хірургічного втручання від типу та індивідуальних особливостей тканини, температури і часу експозиції, кількості послідовних кріовпливів. Досвід застосування низьких температур для деструкції пухлин свідчить, що температура заморожування тканини в центрі об'єкта повинна бути не менш  $-50^{\circ}\text{C}$ , а на периферії – до  $-40^{\circ}\text{C}$  [10]. При цьому клітини багатьох типів чутливі до заморожування й при менш низькій температурі ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) [8, 11, 19].

До факторів, які перешкоджають зниженню температури в місці кріовпливу, відносять теплообмін навколишніх тканин, гістологічні особливості охолоджувальної тканини, швидкість кровообігу і мікроциркуляції [26]. Це цілком відноситься до тканини ЩЗ, яка в нормі має високу швидкість кровообігу та щільність судинного русла, а за гіперпластичних процесів в ній спостерігається підвищення васкуляризації [22, 25], тобто патологічно змінена тканина ЩЗ відрізняється за теплопровідністю та теплоємністю від нормальної. У зв'язку зі складністю отримання надійних розрахункових даних для досягнення необхідної температури заморожування та для вибору тактики кріодеструкції патологічно зміненої тканини ЩЗ необхідно проведення модельних експериментів на лабораторних тваринах.

Відомо, що введення пропілтіурацилу (ПТУ) експериментальним тваринам призводить до змін структури тканини, патоморфологічні ознаки якої подібні до тих, що спостерігаються при ДВУ

devices enables performing such surgeries under visual control. To date, the efficiency of percutaneous ethanol ablation ('ethanol sclerotherapy') of thyroid cysts has been proven [23]. Laser, radiofrequency and microwave ablations are used for therapy of TG BN when any surgery is contraindicated [9, 15, 24].

Cryoablation is less common in clinical practice, but in therapy of TG BN it shows promising results [10, 11]. This method advantages can be outlined as follows: low cost, less invasiveness; low risk for bleeding; reduction of anaesthetic drug use due to an analgesic effect of freezing; 'cryoimmunological' effect; reduced time of surgery and postoperative period, high cosmetic effect [5, 6, 21].

The main principles of current cryosurgery include rapid cooling of tissue, its slow thawing and repeated freeze-warming cycles [7]. When implementing cryoablation, the dependency of surgery on the type and individual characteristics of tissue, temperature and exposure time, number of sequential cryoablations should be taken into account. The experience of using low temperatures for tumor ablation suggests the temperature of tissue freezing to be at least  $-50^{\circ}\text{C}$  in the object center, and to  $-40^{\circ}\text{C}$  at the periphery [7]. Herewith, many types of cells are sensitive to freezing at higher temperature ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) [3, 8, 19].

The factors, preventing temperature decrease at cryoablation area include the heat exchange of surrounding tissues, histological features of cooled tissue, blood circulation and microcirculation [26]. This can be applied to TG tissue, which normally has a high rate of circulation and vascular density. However, under hyperplastic processes an increased vascularisation may be observed [22, 25], because the pathologically altered TG tissue differs in thermal conductivity and heat capacity from the normal one. Since obtaining the reliable calculated data to achieve the required freezing temperature and to choose the cryoablation strategy for pathologically altered TG tissue is complicated, the model experiments involving laboratory animals are needed.

It is known that the introduction of propylthiouracil (PTU) to experimental animals results in changes in tissue structure, pathomorphological features of which are similar to those observed in TG BN [4, 14, 16, 20]. Therefore, we selected this model to study the cryoablation parameters for pathologically altered TG tissue.

Thus, the objective of the research was to compare the temperature changes during cryoablation of TG tissue under normal conditions and with propylthiouracil-induced diffuse hyperplasia.



ЩЗ [2, 4, 15, 20]. На підставі вищевикладеного дану модель було обрано для дослідження параметрів кріодеструкції патологічно зміненої тканини ЩЗ.

Мета роботи – порівняння температурних змін у процесі кровопливу на тканину ЩЗ в нормі та за умов пропілтіоураціл-індукованої дифузної гіперплазії.

### Матеріали та методи

Експерименти проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006) з дотриманням вимог комітету з біоетики Інституту, узгоджених із положеннями «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

У роботі використовували 6-місячних самок щурів лінії SHR. Тварин утримували у віварію Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків) з вільним доступом до збалансованого сухого корму («Гора», Україна). Контролем були інтактні тварини (група 1,  $n = 8$ ). Для моделювання дифузної гіперплазії ЩЗ (група 2,  $n = 8$ ) щурам впродовж 90 діб у питній воді давали 0,1%-й розчин ПТУ («Sigma», США) за методом С. Polychronakos та співавт. [17].

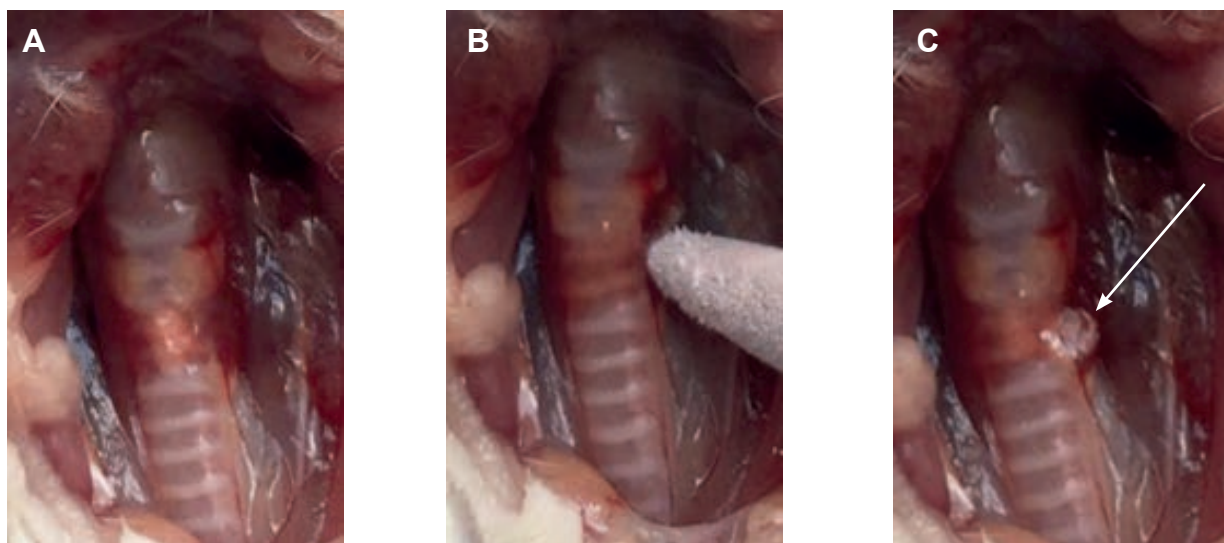
Кріодеструкцію проводили під загальною анестезією: 7,5 мг/кг маси тилетаміну гідрохлориду; 7,5 мг/кг маси золазепаму гідрохлориду (препарат «Золетіл», «Virbac», Франція); 20 мг/кг маси ксилазину гідрохлориду (препарат «Седазин», «Biowet», Польща). На передній поверхні

### Materials and methods

Experiments were performed 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 NAS of Ukraine, agreed to the statements of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

The 6-month-old SHR female rats were used in this study. The rats were housed in the animal facility of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine (Kharkiv) at *ad libitum* feeding with balanced dry food (Gora, Ukraine). Intact animals (group 1,  $n = 8$ ) served as a control. To simulate a diffuse hyperplasia of thyroid gland (group 2,  $n = 8$ ), the rats were administered with a 0.1% PTU (Sigma, USA) for 90 days in drinking water by the method described by Polychronakos S. *et al.* [17].

Cryoablation was performed with general anesthesia: 7.5 mg / kg body weight of tiletamine hydrochloride; 7.5 mg / kg body weight of zolazepam hydrochloride (Zoletil, Virbac, France); 20 mg / kg of body weight of xylazine hydrochloride (Sedazine, Biowet, Poland). A linear skin incision of up to 2 cm length was done on the anterior neck surface of animals. To make an access to thyroid gland, the neck subcutaneous tissue and subcutaneous muscle were separated, the prethyroid muscles were moved aside (Fig. 1A).



**Рис. 1.** Кріодеструкція лівої частки ЩЗ щура. **А** – хірургічний доступ; **В** – кріоаплікатор в момент кровопливу; **С** – тканина ЩЗ безпосередньо після кровопливу. Стрілкою вказана зона проморожування тканини (iceball).

**Fig. 1.** Cryoablation of left TG lobe in rat. **A** – surgical access; **B** – cryoprobe at the time of cryoablation; **C** – TG tissue immediately after cryoablation. Arrow indicates the iceball in tissue.



шиї тварин виконували лінійний розріз шкіри до 2 см. Доступ до ЩЗ формували сепарацією підшкірної клітковини і підшкірного м'яза ший, претиреоїдні м'язи брали «на держалку» і відводили в бік (рис. 1, А).

Кріовплив на ліву частку ЩЗ проводили при кімнатній температурі (22°C) мідним кріоаплікатором з діаметром наконечника 1,5 мм і об'ємом охолоджувальної частини 21,99 см<sup>3</sup> (рис. 1, В, С), який охолоджували до температури -196°C шляхом прямого занурення в рідкий азот і витримування до повного припинення активного кипіння азоту. Здійснювали один кріовплив з експозицією 60 с або два послідовних кріовпливів з експозицією 120 с кожний, між проведенням яких тканина ЩЗ самовільно відігрівалася.

Контролювали процес охолодження тканини ЩЗ мідь-константановими термопарами (ТП), схема розташування яких представлена на рис. 2. Показання ТП реєстрували за допомогою пристроїв «ОВЕНМВ-110» і «ОВЕНАС4» («Овен», Росія), які підключені до персонального комп'ютера. Згідно з технічними характеристиками приладів похибка вимірювання температури становила  $\pm 0,25\%$ . Для обробки отриманих даних використовували програми «Owen Process Vanager 1.2» і «Owen Report Wiewer 1.2» («Овен», Росія).

У експериментах визначали наступні показники (рис. 3):

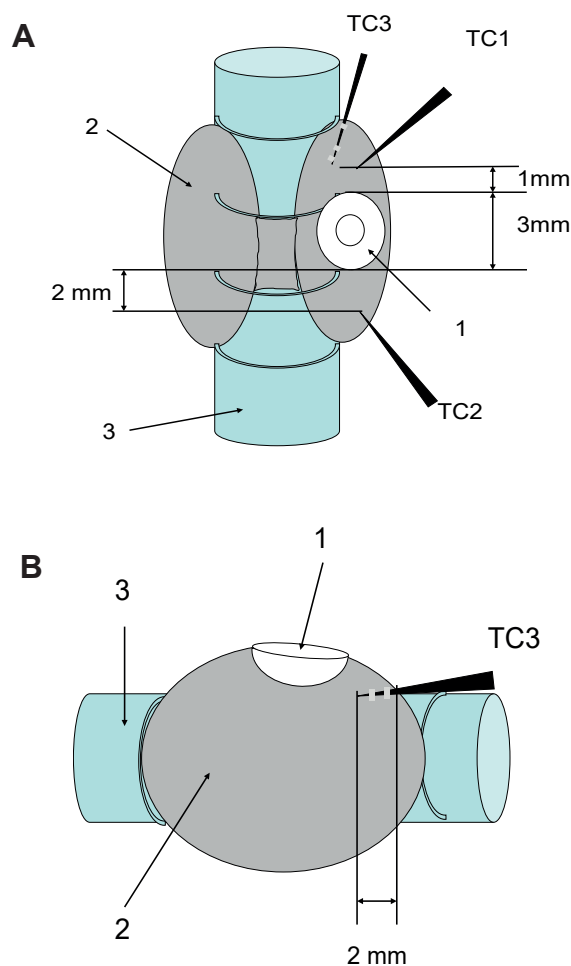
$T_{n_{\min}}$  – мінімальне значення температури, що фіксується кожною з термопар ( $n$  – номер термопари,  $n = 1, 2, 3$ ) у процесі охолодження зразка, після якого починається підвищення температури;

$\Delta T_n$  – максимальна різниця температур, що фіксується кожною з термопар у процесі виконання експерименту: температурний інтервал  $T_0 \dots T_{n_{\min}}$ , де  $T_0$  – температура зразка на початку процесу охолодження;  $T_{n_{\min}}$  – мінімальне значення температури для кожної термопари ( $n$  – номер термопари,  $n = 1, 2, 3$ );

$\Delta t$  – довжина горизонтальної ділянки на термограмі охолодження, яка відповідає процесу кристалізації тканини в місці прикладення кріоаплікатора:  $\Delta t = \tau_1 - \tau_0$ , де  $\tau_1$  – час закінчення кристалізації зразка (точка перегину кривої при температурі  $T_1$  на термограмі охолодження);  $\tau_0$  – час початку охолодження зразка;

$\Delta t_{\min}$  – час охолодження зразка до мінімальної температури:  $\Delta t_{\min} = \tau_4 - \tau_0$ , де  $\tau_4$  – час, після закінчення якого була досягнута температура  $T_{\min}$ ;  $\tau_0$  – час початку охолодження зразка.

Після кріодеструкції тваринам пошарово накладали шви, повертали в умови віварію і припиняли введення 0,1%-го розчину ПТУ. Через



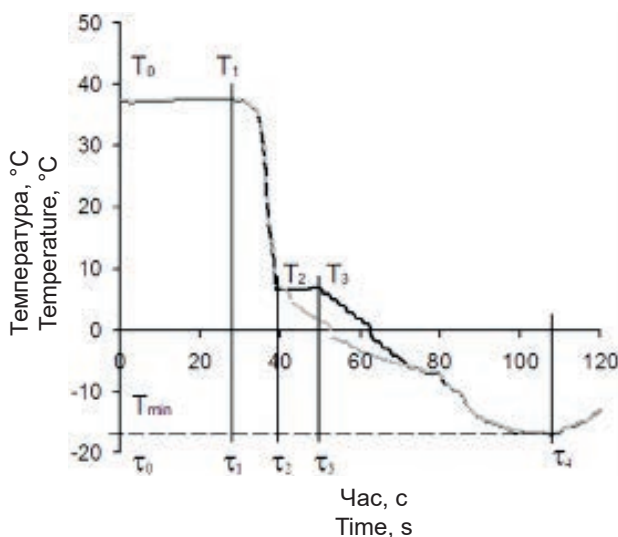
**Рис. 2.** Схема експерименту з кріодеструкції ЩЗ: **А** – вигляд спереду; **В** – вигляд збоку. 1 – місце прикладання кріоаплікатора та зона проморожування (iceball); 2 – щитовидна залоза; 3 – трахея; TC1, TC2 – положення ТП на поверхні ЩЗ; TC3 – положення ТП в глибині ЩЗ біля трахеї.

**Fig. 2.** Design of experiment on TG cryoablation: **A** – front view; **B** – side view. 1 – site of cryoprobe application and the iceball; 2 – thyroid gland; 3 – trachea; TC1, TC2 – TC location on TG surface; TC3 – TC location in TG depth near trachea.

Cryoablation of the left lobe of TG was performed at room temperature (22°C) using a copper cryoprobe with a tip diameter of 1.5 mm and cooling part volume of 21.99 cm<sup>3</sup> (Fig. 1B, C), cooled down to -196°C by direct immersion into liquid nitrogen and exposed until complete cessation of nitrogen active boiling. One 60-second or two sequential 120-second cryoablation sessions separated by uncontrollable thawing were performed.

The TG tissue cooling was controlled with copper-constantan thermocouples (TC), the location of which is shown in Fig. 2. The TC data were recorded using OWEN MV-110 and OWEN AC4 devices (Owen, Russia), connected to PC. According





**Рис. 3.** Типовий вид термограми охолодження з параметрами, які визначали за її допомогою.

**Fig. 3.** Typical cooling thermogram, and the parameters we determined with it.

21 добу після кріодеструкції тварин виводили з експерименту шляхом декапітації.

Для гістологічних досліджень ліву частку ЩЗ тварин фіксували в 10%-му нейтральному формаліні, після чого їх піддавали гістологічній проводці. Готували гістологічні зрізи товщиною 5–7 мкм і забарвлювали гематоксиліном і еозинном за стандартною методикою [3]. Гістологічні зрізи досліджували з використанням світлового мікроскопа «AmScope XYL-403» («AmScope», Китай) з цифровою камерою ТСС-5.0ІСЕ (5 mPx, «Tucsen», Китай). Для гістологічного дослідження кількість зрізів для кожного зразка ЩЗ дорівнювала 7–9. Морфологічні вимірювання проводили для кожного зрізу з використанням програми «AxioVision Rel. 4.8» («CarlZeiss», Німеччина).

Для статистичного аналізу даних використовували програмний додаток «Statistica 10» («StatSoft», США). Результати експериментів представляли у вигляді медіани  $\pm$  інтерквартильний розмах (ІР), який визначали як різницю між кuartилями 3- і 1-го порядків. Статистичну значущість відмінностей між групами оцінювали за допомогою непараметричного критерію Манна-Уїтні. Відмінності вважали значущими при  $p < 0,05$ .

### Результати та обговорення

При макроскопічній оцінці ЩЗ у інтактних щурів спостерігалися дві частки блідо-рожевого кольору, помірно щільної консистенції, звичайної форми та розміру. Гістологічний аналіз тканини ЩЗ виявив фолікули різних розмірів: більш дрібні розташовувалися в товщі органа, а великі – на периферії. Фолікули були висте-

то до технічних характеристик цих пристроїв, похибка вимірювання температури становила  $\pm 0,25\%$ . Дані отримані були оброблені за допомогою програмного забезпечення Owen Process Vanager 1.2 та Owen Report Viewer 1.2 (Owen, Russia).

Під час експериментів були визначені наступні показники (рис. 3):

$T_{n_{min}}$  – мінімальна температура, зареєстрована кожним з термопар (n – номер термопар, n = 1, 2, 3) під час охолодження зразка, після чого починається підйом температури;

$\Delta T_n$  – максимальна різниця температур, зареєстрована кожним з термопар під час експерименту, *т. є.* діапазон температур  $T_0 \dots T_{n_{min}}$ , де  $T_0$  – температура зразка на початку охолодження;  $T_{n_{min}}$  – мінімальна температура для кожної термопар (n – номер термопар, n = 1, 2, 3);

$\Delta \tau$  – довжина горизонтальної ділянки на охолодженні термограми, що відповідає кристалізації тканини в місці застосування криопроби:  $\Delta \tau = \tau_1 - \tau_0$ , де  $\tau_1$  – час, коли закінчується кристалізація зразка (точка згинання кривої на термограмі охолодження);  $\tau_0$  – час початку охолодження зразка;

$\Delta \tau_{min}$  – час, зареєстрований для охолодження зразка до мінімальної температури:  $\Delta \tau_{min} = \tau_4 - \tau_0$ , де  $\tau_4$  – час досягнення  $T_{min}$ ;  $\tau_0$  – час початку охолодження зразка.

Після кріоабляції, розрізи шкіри тварин були зашиті шар за шаром. Тварин повернули до умов тваринного господарства та застосування 0,1% ПТУ було зупинено. Тварини були зарезані за декапітації на 21 добу після кріоабляції.

Для гістологічних досліджень, ліву частку щурів фіксували в 10% нейтральному формаліні, після чого їх піддавали гістологічній проводці. Готували гістологічні зрізи товщиною 5–7 мкм і забарвлювали гематоксиліном і еозинном за стандартною методикою [13]. Для гістологічного дослідження кількість зрізів для кожного зразка ЩЗ дорівнювала 7–9. Для гістологічного дослідження використовували світловий мікроскоп AmScope XYL-403 (AmScope, China) з цифровою камерою ТСС-5.0ІСЕ (5 mPx, Tucsen, China). Для гістологічного дослідження кількість зрізів для кожного зразка ЩЗ дорівнювала 7–9. Для гістологічного дослідження використовували світловий мікроскоп AmScope XYL-403 (AmScope, China) з цифровою камерою ТСС-5.0ІСЕ (5 mPx, Tucsen, China). Для гістологічного дослідження кількість зрізів для кожного зразка ЩЗ дорівнювала 7–9. Для гістологічного дослідження використовували світловий мікроскоп AmScope XYL-403 (AmScope, China) з цифровою камерою ТСС-5.0ІСЕ (5 mPx, Tucsen, China).

Для статистичного аналізу даних використовували програмний додаток «Statistica 10» («StatSoft», США). Результати експериментів представляли у вигляді медіани  $\pm$  інтерквартильний розмах (ІР), який визначали як різницю між кuartилями 3- і 1-го порядків. Статистичну значущість відмінностей між групами оцінювали за допомогою непараметричного критерію Манна-Уїтні. Відмінності вважали значущими при  $p < 0,05$ .



лені кубічним епітелієм, в їхній порожнині був присутній ацидофільний колоїд з вакуолями резорбції (рис. 4, А).

У щурів, яким вводили в питний раціон 0,1%-й розчин ПТУ, звертали на себе увагу збільшені розміри і виражена щільність залози. Мікроскопічне дослідження виявило патогістологічні зміни (рис. 4, В). Частки залози були в основному утворені мікрофолікулами із залишками щільного базофільного колоїду або без нього. Фолікуляр-

## Results and discussion

Macroscopic evaluation of intact rats' TG showed two moderately dense lobes of normal shape and size, of pale pink colour. Histological analysis of TG tissue revealed the follicles of different sizes. The smaller ones were located in organ interior, and the large ones were at the periphery. Follicles were lined with cubic epithelium, and an acidophilic colloid with resorption vacuoles was seen in their cavity (Fig. 4A).

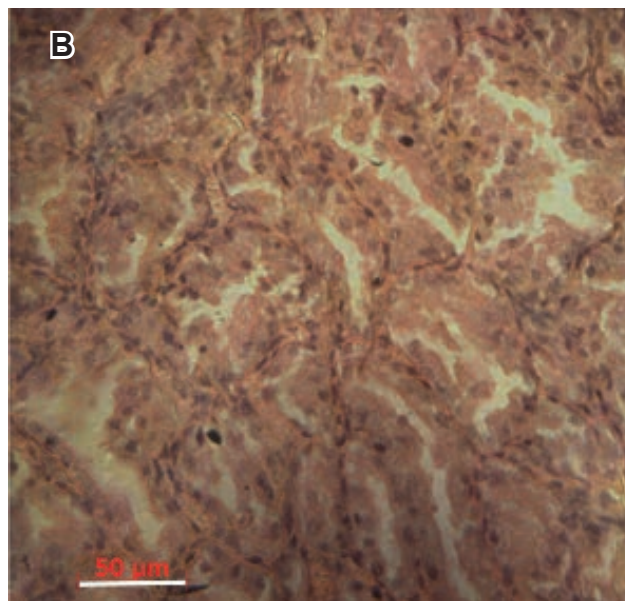
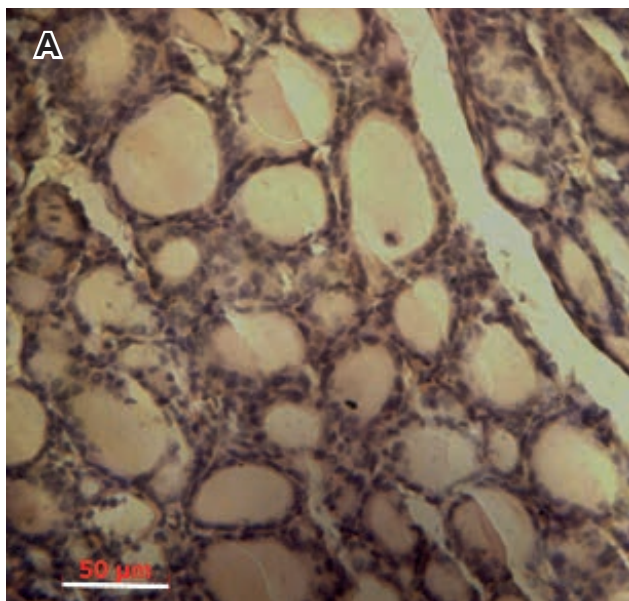


Рис. 4. Мікрофотографії зрізів ЩЗ щура: А – контроль (група 1); В – введення 0,1%-го розчину ПТУ (група 2). Забарвлення гематоксиліном і еозином.

Fig. 4. Micrographs of rat TG sections: A – control (group 1); B – administration of 0.1% PTU solution (group 2). H&E stain.

ний епітелій мав призматичну форму, був розташований в кілька шарів, практично повністю заповнюючи просвіт фолікулів. Часто зустрічалися фолікули з сосочковими структурами. Таким чином, гістологічні дослідження показали значні структурні зміни в тканині ЩЗ щурів, які отримували ПТУ.

Відомо, що охолодження нормальної тканини ЩЗ до  $-20^{\circ}\text{C}$  є достатнім для того, щоб спричинити некроз клітин, зміну гістологічної структури органа і зниження продукції гормонів [18]. Виходячи з цих даних температура  $-20^{\circ}\text{C}$  була обрана мінімальною (цільова), яку необхідно забезпечити в зоні проморожування для коректного моделювання процесу кріодеструкції тканини ЩЗ.

У процесі кріовпливу на ЩЗ в кожному експерименті спостерігали зону проморожування діаметром  $(3 \pm 0,2)$  мм (див. рис. 1, В). Термограми охолодження, які були зареєстровані в процесі заморожування зразків, мали загальну ознаку – наявність горизонтальної ділянки на початковому етапі охолодження ( $\tau_0 \dots \tau_1$ ), впродовж якої темпе-

The rats received 0.1% PTU had increased TG of considerable density. Microscopic examination revealed some pathohistological changes (Fig. 4B). The gland lobes were mostly formed by microfollicles with residues of dense basophilic colloid or without it. Follicular epithelium had a prismatic shape. It had several layers, and filled almost all follicle lumen. Follicles with papillary structures were common. Thus, histological studies showed significant structural changes in TG tissue of PTU rats.

It is known that cooling of intact TG tissue down to  $-20^{\circ}\text{C}$  may cause cell necrosis, change organ's histological structure and reduce hormone production [18]. Taking into account these data, we selected the temperature of  $-20^{\circ}\text{C}$  as the minimum, which should be achieved in the iceball to simulate TG tissue cryoablation.

During TG cryoablation, the iceball of  $(3 \pm 0.2)$  mm diameter was observed in each experiment (see Fig. 1B). The cooling thermograms, registered during samples' freezing had a common feature, *i. e.* the horizontal segment at the initial stage of cooling ( $\tau_0 \dots \tau_1$ )



ратура зразка не змінювалася ( $T_0 = T_1$ ) (див. рис. 3). Горизонтальна ділянка ( $\tau_0 \dots \tau_1$ ) на кривій охолодження обумовлена взаємною компенсацією холодового впливу кріоаплікатора на тканину та питомої теплоти кристалотворення, яка виділяється в процесі заморожування відповідної ділянки тканини. Довжина цієї ділянки за однакових умов охолодження значною мірою залежить від теплофізичних характеристик зразка та особливостей його гістологічної структури.

Спостережуваний далі на кривих охолодження різкий спад температури ( $T_1 \dots T_2$ ) на ділянці ( $\tau_1 \dots \tau_2$ ) пов'язаний з охолодженням більш глибоких шарів тканини (див. рис. 3). Достатня кількість холоду, що надходить від кріоаплікатора, забезпечує подальшу кристалізацію води у них, тоді як недостатня кількість викликає повільне охолодження тканини без кристалотворення. У першому випадку на кривій охолодження спостерігається ще одна горизонтальна ділянка ( $\tau_2 \dots \tau_3$ ) в інтервалі температур ( $T_2 \dots T_3$ ), в другому випадку – повільне зниження температури від значення  $T_2$  до  $T_{\min}$ . Після досягнення  $T_{\min}$  на ділянці кривій ( $\tau > \tau_4$ ) відображається підвищення температури тканини ЩЗ внаслідок конвективного нагріву мідного аплікатора навколишнім повітрям.

Криві охолодження, отримані в експерименті на тваринах, можуть мати певні відмінності для різних особин, але загальний вигляд кривої охолодження зберігає описані тенденції.

Значення мінімальної температури ( $T_{\min}$ ), яка фіксувалася за допомогою першої термопари (ТП1), знаходилися в інтервалі від  $-24$  до  $-47^\circ\text{C}$  як при кріодеструкції ЩЗ контрольних (група 1), так і експериментальних (група 2) тварин (рис. 5, А). Таким чином, при даному типі та конфігурації кріоаплікатора в зоні проморожування досягалася цільова температура  $-24^\circ\text{C}$  і нижче, незалежно від структури тканини ЩЗ.

Термограми, які фіксувалися за допомогою другої термопари (ТП2), характеризувалися меншими значеннями  $T_{2\min}$  (від  $4,8$  до  $-14,5^\circ\text{C}$ ), що пояснюється більшою віддаленістю ТП2 від зони прикладення кріоаплікатора (рис. 5, В, С). При цьому значення медіан  $\Delta T_2$  і  $\Delta \tau_{\min}$  значуще не відрізнялися у тварин обох груп (таблиця), проте показник  $\Delta \tau$ , який характеризує довжину ділянки ( $\tau_0 \dots \tau_1$ ), був статистично значуще ( $p < 0,05$ ) більшим у зразках ЩЗ із дифузною гіперплазією (група 2) у порівнянні з контролем (група 1). Отримані результати свідчать про відмінності теплофізичних характеристик інтактної і патологічно зміненої під дією ПТУ тканини ЩЗ.

Одним із принципів кріохірургії є забезпечення локальної деструкції тканини при досить низь-

during which the sample's temperature remained unchanged ( $T_0 = T_1$ ) (see Fig. 3). The horizontal site ( $\tau_0 \dots \tau_1$ ) on cooling curve was stipulated by the mutual compensation of cold effect of cryoprobe on tissue and specific heat of crystal formation, released during freezing of the corresponding site of tissue. Under the same cooling conditions, the site length largely depended on samples' thermophysical characteristics and its histology.

A sharp decrease in temperature ( $T_1 \dots T_2$ ) observed on cooling curves at the site ( $\tau_1 \dots \tau_2$ ) was associated with cooling of deeper tissue layers (see Fig. 3). Sufficient amount of cold, coming from cryoprobe provided further crystallization of water, whereas an insufficient amount caused slow cooling of tissue with no crystal formation. In the first case, we found one more horizontal site ( $\tau_2 \dots \tau_3$ ) on cooling curve within ( $T_2 \dots T_3$ ) temperature range, and in the second case there was slow temperature decrease from  $T_2$  value down to  $T_{\min}$ . After reaching  $T_{\min}$ , the curve site ( $\tau > \tau_4$ ) showed a temperature increase in TG tissue caused by surrounding air convection heating of copper probe.

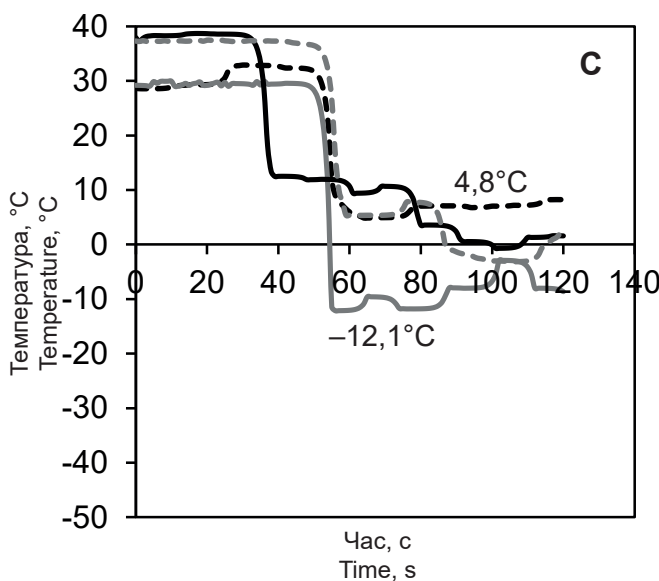
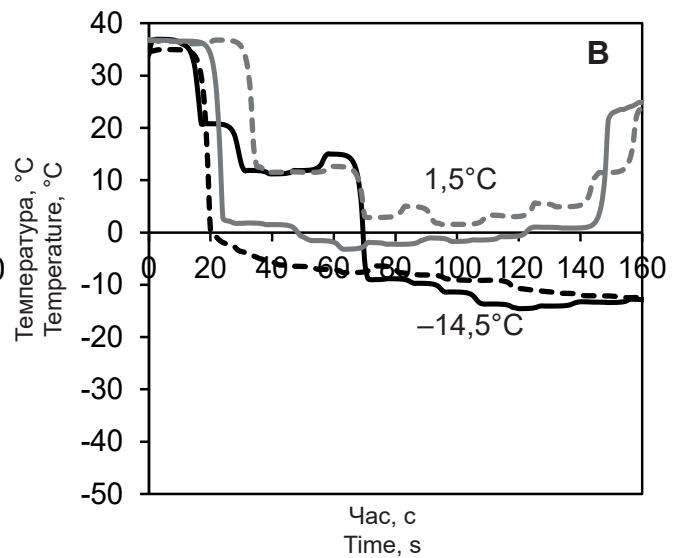
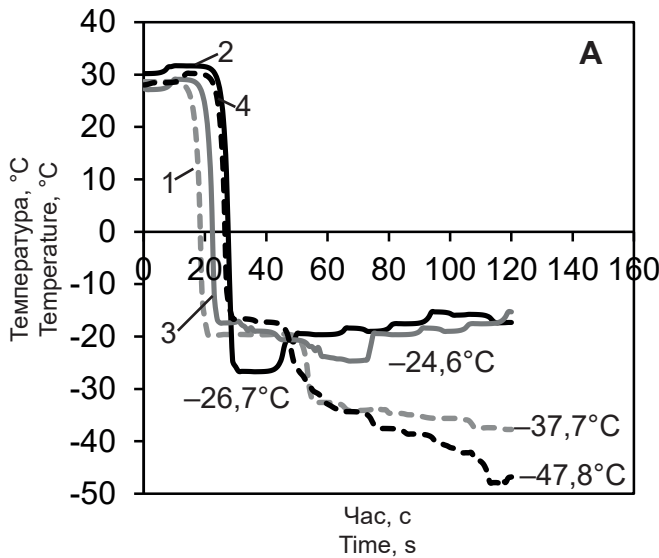
The cooling curves, obtained in animal experiment may have some distinctions for different individuals, but the general view of the cooling curve retains its tendency.

The values of minimum temperature ( $T_{\min}$ ), recorded by the first thermocouple (TC1), were within the range from  $-24$  to  $-47^\circ\text{C}$  in TG cryoablated control (group 1) and experimental (group 2) animals (Fig. 5A). Thus, using this type and configuration of cryoprobe, the required temperature of  $-20^\circ\text{C}$  and below was achieved in the iceball regardless of TG tissue structure.

The thermograms, recorded by second thermocouple (TC2) were characterized by lower values of  $T_{2\min}$  (from  $4.8$  down to  $-14.5^\circ\text{C}$ ), which might be interpreted by the greater distance of TP2 from the cryoprobe application area (Fig. 5B, C). Herewith, the medians of  $\Delta T_2$  and  $\Delta \tau_{\min}$  did not significantly differ between animals of both groups (Table), but the index of  $\Delta \tau$ , characterizing the length of ( $\tau_0 \dots \tau_1$ ) site, was significantly ( $p < 0.05$ ) higher in TG samples with diffuse hyperplasia (group 2) as compared with the control (group 1). Our findings display the differences in thermophysical characteristics of intact TG tissue and the PTU-altered pathological tissue.

To ensure the local tissue destruction at quite low temperatures, and preservation of adjacent vital structures is among the principles of cryosurgery. This effect is possible due to a protective thermal effect of blood circulation [12,





**Рис. 5.** Репрезентативні термограми охолодження ЩЗ щурів 1 (контроль) та 2 (експеримент) груп: **А** – термограми, які фіксувала ТП1 під час криодеструкції ЩЗ щурів групи 1 (крива 1) та групи 2 (криві 2–4); **В, С** – термограми, які фіксувала ТП2 при криодеструкції ЩЗ щурів 1 (**В**) та 2 (**С**) груп. Цифрами вказана  $T_{\min}$ , яка досягнута в експерименті.

**Fig. 5.** Representative thermograms of TG cooling in rats of groups 1 (control) and 2 (experiment) rats: **A** – thermograms recorded by TC1 during TG cryoablation in rats from groups 1 (curve 1) and 2 (curves 2–4); **B, C** – thermograms recorded by TC2 during TG cryoablation in rats from groups 1 (**B**) and 2 (**C**). The  $T_{\min}$  achieved in experiment is indicated by figures.

ких температурах, але з одночасним збереженням прилеглих життєво важливих структур. Такий ефект можливий завдяки захисній тепловій дії кровообігу [14, 26]. Однак в кожному конкретному випадку необхідно визначати температури під час кріовпливу. Відомо, що в процесі кріовпливу в тканині формуються зони з градієнтом температур від негативних (зона проморожування) до позитивних (зона гіпотермії) [6]. У наших експериментах принципово важливим було з'ясувати, яка температура досягається в місці з'єднання ЩЗ із трахеєю, для чого була використана ТПЗ. Одночасний моніторинг температури за допомогою ТП1 (близько зони проморожування) та ТПЗ (близько трахеї) показав, що близько трахеї мінімальна температура  $T_{3\min}$  знаходилася біля нульових температур (від 4,8 до  $-3,1^{\circ}\text{C}$ ), а в зоні проморожування  $T_{1\min}$  сягала до  $-41,3^{\circ}\text{C}$  (рис. 6).

У раніше опублікованих роботах були використані різні режими криодеструкції ЩЗ, які від-

26]. However, the temperatures during cryoablation should be monitored in each case. It is well known that the areas having temperature gradient from negative temperature (the iceball) to positive one (hypothermia area) are formed in a tissue during cryoablation [5]. In this research, of great importance was to find out the temperature, reached at the site of TG junction with trachea. The TC3 was used for the purpose. Simultaneous temperature monitoring by means of TC1 (near the iceball) and TC3 (near the trachea) showed the minimum temperature  $T_{3\min}$  near trachea to be about zero (from 4.8 down to  $-3.1^{\circ}\text{C}$ ), when  $T_{1\min}$  reached  $-41.3^{\circ}\text{C}$  in freezing area (Fig. 6).

In recent papers, various modes for TG cryoablation have been reported [11, 18, 19]. They differ in cryoprobe exposure time and the number of cryoablation sessions (single cryoablation for 60 s and double for 45 and 60 s).

Taking into account different thermophysical characteristics of TG tissue with PTU-induced diffuse hyperplasia, the use of cryoablation modes, established for the intact tissue, was incorrect.

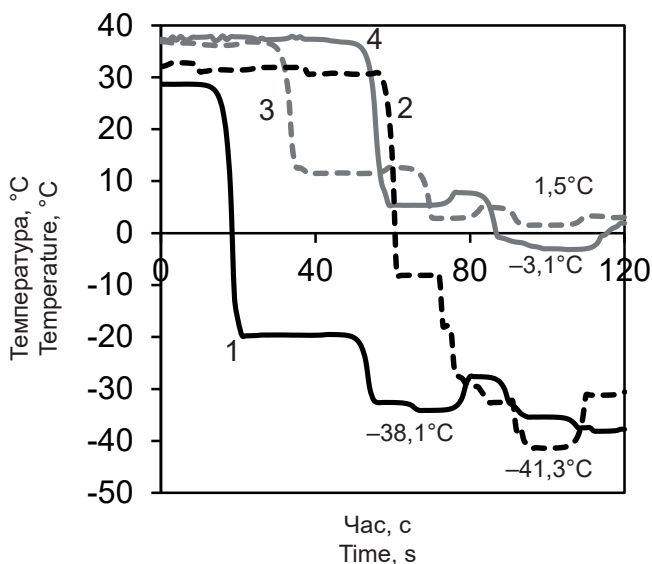


різнялися за часом експозиції кріоаплікатора і кількістю кріовпливів: одноразовий впродовж 60 с і дворазовий впродовж 45 та 60 с [5, 18, 19].

З огляду на відмінності теплофізичних характеристик тканини ЩЗ із ПТУ-індукованою дифузною гіперплазією використання режимів кріодеструкції, встановлених для нормальної тканини, було некоректним. У зв'язку з цим, нами було вивчено патогістологічні зміни тканини ЩЗ щурів групи 2 за різних режимів кріовпливу. Для порівняння ми вибрали два режими кріовпливу: 1 – одноразовий з експозицією кріоаплікатора протягом 60 с; 2 – дворазовий з експозицією кріоаплікатора протягом 120 с кожний.

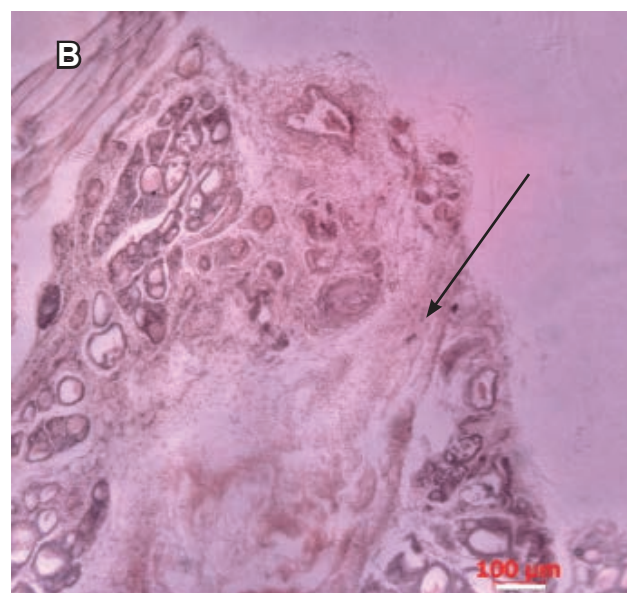
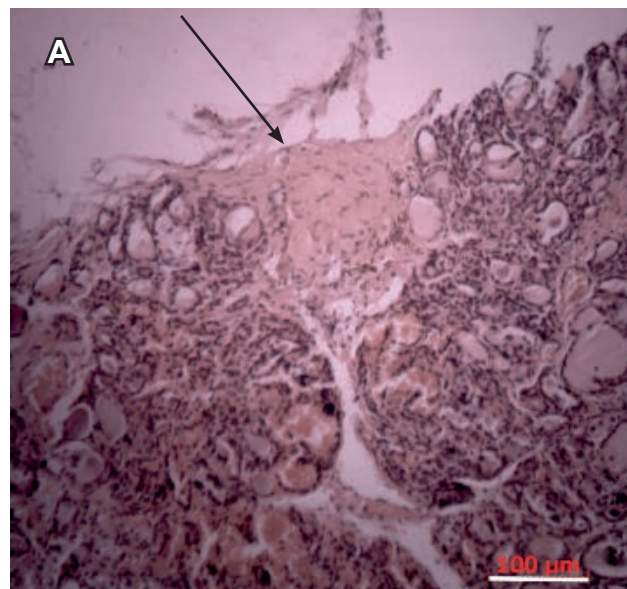
Гістологічний аналіз зразків ЩЗ, підданих кріодеструкції за обома режимами, показав патологічні зміни тканини на 21-шу добу після операції. У тканині, підданій кріовпливу за режимом 1, спостерігалось вогнище фіброзу у вигляді півкулі з вираженими ознаками васкуляризації та незначною лімфоцитарно-гістіоцитарною інфільтрацією (рис. 7, А). При цьому глибина, на яку поширювалися фіброзні зміни, в середньому становила  $(279,5 \pm 50)$  мкм, а ширина –  $(384 \pm 165,5)$  мкм.

Після кріовпливу за режимом 2 у тканині ЩЗ спостерігалися подібні гістопатологічні зміни



**Рис. 6.** Репрезентативні термограми охолодження ЩЗ щурів груп 1 (криві 1, 3) та 2 (криві 2, 4), які одночасно реєструвалися ТП1 (криві 1, 2) та ТП3 (криві 3, 4). Цифрами вказана  $T_{min}$ , досягнута в експерименті. Приведено дані двох експериментів.

**Fig. 6.** Representative thermograms of TG cooling in rats of groups 1 (curves 1, 3) and 2 (curves 2, 4), registered simultaneously by TC1 (curves 1, 2) and TC3 (curves 3, 4). The  $T_{min}$  achieved in the experiment is marked by figures. The data of two experiments are shown.



**Рис. 7.** Мікрофотографії зрізів ЩЗ щурів групи 2 на 21-ту добу після кріовпливу: **А** – кріовплив за режимом 1; **В** – кріовплив за режимом 2. Стрілками позначено зону фіброзу.

**Fig. 7.** Micrographs of TG sections of rats from group 2 to day 21 after cryoablation: **A** – cryoablation by mode 1; **B** – cryoablation by mode 2. Arrows indicate the fibrosis area.

In this regard, we have studied the histopathological changes in TG tissue of group 2 rats under different regimens of cryoablation. To compare, we have selected two modes of cryoablation: the mode 1 was a single procedure with 60-second cryoprobe exposure; the mode 2 consisted of two procedures with 120-second exposure each.

Histological analysis of TG samples, subjected to cryoablation by both modes showed pathological changes in tissue to day 21 after surgery. In tissue cryoablated by the mode 1, we observed a hemisphere-shaped focus of fibrosis with pronoun-



(рис. 7, В), проте зона фіброзу була набагато більшою: глибина ( $1156,5 \pm 185,7$ ) мкм, ширина ( $812,5 \pm 189$ ) мкм.

Відомо, що механізм кріодеструкції тканини має два аспекти [6, 10, 11]. По-перше, пряме пошкодження клітин, викликане факторами заморожування-нагрівання (формування внутрішньо- та позаклітинних кристалів льоду, концентрування внутрішньоклітинного середовища внаслідок заморожування води, денатурація білків). По-друге, відстрочені події, які відбуваються в клітинах і мікрооточенні (апоптоз, ішемія внаслідок руйнування мікросудинного русла, набряк, запалення). Обидва типи пошкодження залежать від швидкості охолодження, заданої кінцевої температури охолодження та режиму відтавання. Використання високої швидкості охолодження призводить до підвищеного утворення внутрішньоклітинних кристалів льоду. При цьому швидкість охолодження, а, отже, і пряме пошкодження клітин будуть більшими в місці аплікації кріозонда і меншими на периферії зони проморожування. Відповідно, подовження експозиції кріоаплікатора при досягненні цільової температури збільшує ймовірність прямого ушкодження клітин на периферії.

Клітини різних тканин демонструють неоднакові порогові значення холодової чутливості. Для нормальної тканини ЩЗ щурів емпірично ці показники були визначені в роботі L. Pomorski та співавт. [19]. У нашій роботі встановлено умови кріодеструкції тканини ЩЗ з патологічно зміненою структурою. Виявилось, що ПТУ-індукована дифузна гіперплазія тканини характеризувалася зменшенням колоїдного вмісту фолікулів і збільшенням кількості клітин в їхньому складі. При цьому зміна теплофізичних характеристик тканини призвела до приблизно двократного збільшення довжини ділянки ( $\tau_0 \dots \tau_1$ ) на кривій охолодження.

У кріохірургічній практиці кількість циклів заморожування-нагрівання та час експозиції з кріоаплікатором варіюють залежно від тканини. У роботі L. Pomorski та співавт. [18, 19] в експериментах на нормальній тканині ЩЗ щурів використовували два послідовних кріовпливи з експозицією 60 та 45 с. Для кріодеструкції патологічно зміненої тканини ЩЗ людини В.В. Хазієв та співавт. [5] використовували одноразовий 60-секундний кріовплив. Для черезшкірної кріодеструкції зоба ЩЗ М. Hamed та співавт. [13] застосували трикратний кріовплив, кожний тривалістю 180 с. У нашій роботі встановлено, що одноразовий кріовплив на ЩЗ із дифузною гіперплазією при експозиції кріоаплікатора впродовж 60 с руйнує тканину на глибину не більше 0,3 мм.

ced signs of vascularization and slight lymphocyte and histiocyte infiltration (Fig. 7A). Herewith, the depth to which the fibrotic changes were extended, averaged ( $279.5 \pm 50$ )  $\mu\text{m}$ , and the width was ( $384 \pm 165.5$ )  $\mu\text{m}$ .

After cryoablation by mode 2, the TG tissue showed the same histopathological changes (Fig. 7B), but with much larger fibrosis area, ( $1,156.5 \pm 185.7$ )  $\mu\text{m}$  depth and ( $812.5 \pm 189$ )  $\mu\text{m}$  width.

As it is well known, the mechanism of tissue cryoablation includes two aspects [5, 7, 8]. First, it is direct cell damage caused by freeze-warming factors (formation of intra- and extracellular ice crystals, concentration of intracellular medium due to water freezing, protein denaturation). Second, there are the delayed events occurring in cells and their microenvironment (apoptosis, ischemia as a result of microvascular bed destruction, edema, inflammation). Both types of injuries depend on cooling rate, fixed final temperature of cooling and thawing mode. The use of high cooling rates results in the increased intracellular ice crystal formation. Therefore, the cooling rate and direct damage to cells will be higher at the cryoprobe application site and lower at the iceball periphery. Accordingly, the prolongation of cryoprobe exposure after reaching the target temperature increases the probability of a direct damage to cells at the periphery.

Cells of various tissues show different threshold values of cold sensitivity. For the intact rat TG tissue, these indices were empirically determined by L. Pomorski *et al.* [19]. In this research, we have established the cryoablation conditions for the TG tissue with pathologically altered structure. It has been found out, that the PТУ-induced diffuse hyperplasia of tissue is characterized by a decrease in colloidal content of follicles and the increased cell number within the follicles. Thus, the change in tissue thermophysical characteristics resulted in an approximately twofold increase in the length of ( $\tau_0 \dots \tau_1$ ) site on cooling curve.

In cryosurgical practice, the number of freeze-warming cycles and exposure time with cryoprobe vary depending on tissue type. L. Pomorski *et al.* [18, 19] in the experiments with rat TG tissue under normal conditions, have used two sequential cryoablations with 60- and 45-second exposures. For cryoablation of pathologically altered human TG tissue, V.V. Khaziev *et al.* [11] have used a single 60-second cryoablation. For percutaneous cryoablation of TG goiter, M. Hamed *et al.* [10] have applied a triple cryoablation, 180-second each. Here, a single cryoablation of TG with diffuse hyperplasia under 60-second cryoprobe exposure



Збільшення часу експозиції до 120 с та кількості сеансів кріовпливів до двох приводило до більш вагомого результату: кріодеструкції тканини ЩЗ на глибину більше 1 мм.

### Висновки

1. Порівняльне вивчення температурних змін у процесі кріовпливу на ЩЗ дозволило встановити відмінності термограм зразків інтактної ЩЗ та з ПТУ-індукованої ДГ, які корелюють з термофізичними характеристиками тканини.

2. У щурів з дифузною гіперплазією ЩЗ ефект руйнування тканини на глибину більше ніж 1 мм досягається дворазовим кріовпливом з експозицією кріоаплікатора впродовж 120 с.

3. При кріодеструкції ЩЗ з дифузною гіперплазією кріоаплікатором з вищеназваними характеристиками протягом 120 с у зоні проморожування досягаються цільові значення температури ( $-20^{\circ}\text{C}$  та нижче), тоді як в зоні трахеї спостерігаються біланульові температури, які не є критично низькими для життєво важливих структур.

has been shown to destroy the tissue to a depth of not more than 0.3 mm. Increasing the exposure time up to 120 s and performance of 2 cryoablation sessions led to even more significant results, such as the TG tissue cryoablation to a depth of more than 1 mm.

### Conclusions

1. A comparative study of temperature changes during TG cryoablation enabled establishing the differences in thermograms of samples of intact TG and those with PTU-induced DH, that correlated with thermophysical characteristics of tissue.

2. In rats with TG diffuse hyperplasia the effect of tissue destruction to a depth of more than 1 mm was achieved by double cryoablation with cryoprobe exposure time of 120 s.

3. During 120-second cryoablation of TG with diffuse hyperplasia, the target temperature values ( $-20^{\circ}\text{C}$  and below) in the iceball were reached if using a cryoprobe with the mentioned above characteristics, whereas in tracheal area the near-zero temperatures were observed, which were not too low to damage the vital structures.

### Література

1. Балаболкин МИ, Клебанова ЕМ, Креминская ВМ. Фундаментальная и клиническая тиреологическая: руководство. Москва: Медицина; 2007. 816 с.
2. Бутова ОА, Боташева ВС, Головки ЕМ. Патогистологическая характеристика щитовидной железы при эндемическом зобе. Вестник Ставропольского государственного университета. 2010; (69):182–6.
3. Коржевский ДЭ, Гиляров АВ. Основы гистологической техники; СПб.: СпецЛит, 2015. 807 с.
4. Побеленский КО, Колот НВ, Проценко ОС, та ін. Динаміка морфологічних показників щитовидної залози у гіпертензивних щурів лінії SHR при введенні пропілтіурацилу. Morphologia. 2019; 13 (3): 93–8.
5. Хазієв ВВ, Тяжелова ОВ, Македонська ВО. Сонографічні зміни структури та об'єму щитоподібної залози після локального інтраопераційного кріовпливу у хворих на вузловий еутиреоїдний зоб. Проблеми криобіології і криомедицини. 2013; 23 (3): 240–6.
6. Чиж НА. Эндоскопическая криохирургия. Проблеми криобіології і криомедицини. 2017; 27(1): 3–18.
7. Bergenfelz A, Jansson S, Kristoffersson A, et al. Complications to thyroid surgery: results as reported in a database from a multicenter audit comprising 3,660 patients. Langenbecks Arch Surg 2008; 393 (5): 667–73.
8. Borkowski M, Robinson MJ, Poppiti RJ, et al. Histologic findings in postcryosurgical prostatic biopsies. Mod Pathol. 1996; 9 (8): 807–11.
9. Erinjeri JP, Clark TW. Cryoablation: mechanism of action and devices. J Vasc Interv Radiol. 2010; 21 (8, Suppl): S187–S191.
10. Gage AA, Baust JG. Cryosurgery – a review of recent advances and current issues. CryoLetters. 2002; 23(2): 69–78.

### References

1. Balabolkin MI, Klebanova EM, Kreminskaya VM. [Fundamental and clinical thyroidology: a guide]. Moscow: Medicine, 2007. 816 p. Russian.
2. Bergenfelz A, Jansson S, Kristoffersson A, et al. Complications to thyroid surgery: results as reported in a database from a multicenter audit comprising 3,660 patients. Langenbecks Arch Surg 2008; 393 (5): 667–73.
3. Borkowski M., Robinson MJ, Poppiti RJ, et al. Histologic findings in postcryosurgical prostatic biopsies. Mod Pathol. 1996; 9 (8): 807–11.
4. Butova OA, Botasheva VS, Golovko EM. [Pathological characteristics of the thyroid gland with endemic goiter]. Stavropol State University's Vestnik. 2010; (69):182–6. Russian.
5. Chizh NA. Endoscopic Cryosurgery. Probl Cryobiol Cryomed. 2017; 27(1): 3–18.
6. Erinjeri JP, Clark TW. Cryoablation: mechanism of action and devices. J Vasc Interv Radiol. 2010; 21 (8, Suppl): S187–S191.
7. Gage AA, Baust JG. Cryosurgery – a review of recent advances and current issues. Cryo Letters. 2002; 23(2): 69–78.
8. Gage AA, Baust J. Mechanisms of tissue injury in cryosurgery. Cryobiology. 1998; 37 (3): 171–86.
9. Garberoglio R, Aliberti C, Appetecchia M, et al. Radiofrequency ablation for thyroid nodules: which indications? The first Italian opinion statement. J Ultrasound. 2015; 18 (4): 423–30.
10. Hamed MS, Mansour SZ, Halawa MR, et al. Cryoablation of goiter irrespective of thyroid profile. Thyroid Res Pract. 2019; 16 (1): 6–11.



11. Gage AA, Baust J. Mechanisms of tissue injury in cryosurgery. *Cryobiology*. 1998; 37 (3): 171–86.
12. Garberoglio R, Aliberti C, Appetecchia M, et al. Radiofrequency ablation for thyroid nodules: which indications? The first Italian opinion statement. *J Ultrasound*. 2015;18 (4): 423–30.
13. Hamed MS, Mansour SZ, Halawa MR, et al. Cryoablation of goiter irrespective of thyroid profile. *Thyroid Res Pract*. 2019; 16 (1): 6–11.
14. Kim C, O'Rourke AP, Mahvi DM, et al. Finite-element analysis of ex vivo and in vivo hepatic cryoablation. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2007; 54(7): 1177–85.
15. Laezza C, Mazziotti G, Fiorentino L, et al. HMG-CoA reductase inhibitors inhibit rat propylthiouracil-induced goiter by modulating the ras-MAPK pathway. *Mol Med (Berl)*. 2006; 84 (11): 967–73.
16. Morelli F, Sacrini A, Pompili G, et al. Microwave ablation for thyroid nodules: A new string to the bow for percutaneous treatments? *Gland Surg*. 2016; 5(6): 553–8.
17. Polychronakos C, Guyda HJ, Patel B, et al. Increase in the number of type II insulin-like growth factor receptors during propylthiouracil-induced hyperplasia in the rat thyroid. *Endocrinology*. 1986; 119 (3): 1204–9.
18. Pomorski L, Bartos M, Amsolik M, et al. Thyroid cryotherapy in an experimental rat model-topography of temperature during therapy and functional results. *Cryobiology*. 2000; 41 (1): 51–7.
19. Pomorski L, Bartos M, Matejkowska M, et al. Thyroid cryotherapy in an experimental rat model. *Cryobiology*. 1999; 39 (3): 262–70.
20. Rognoni JB, Penel C, Bastiani P, et al. Involution of hyperplastic goitre in the adult male rat. Tissue compartment process with early iodide effect: a stereological and biochemical study. *Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1987; 53 (3): 166–75.
21. Sabel MS. Cryo-immunology: A review of the literature and proposed mechanisms for stimulatory versus suppressive immune responses. *Cryobiology*. 2009; 58 (1): 1–11.
22. Tegler L, Gillquist J, Anderberg B, Lundström B, Johansson H. Thyroid blood flow rate in man. Electromagnetic flowmetry during operation in euthyroid normal gland, nontoxic goiter, and hyperthyroidism. *J Endocrinol Invest*. 1981; 4 (3): 335–41.
23. Valcavi R, Frasoldati A. Ultrasound-guided percutaneous ethanol injection therapy in thyroid cystic nodules. *Endocr Pract*. 2004; 10 (3): 269–75.
24. Valcavi R, Riganti F, Bertani A, et al. Percutaneous laser ablation of cold benign thyroid nodules: a 3-year follow-up study in 122 patients. *Thyroid*. 2010; 20 (11): 1253–61.
25. Vita R, Di Bari F, Perelli S, et al. Thyroid vascularization is an important ultrasonographic parameter in untreated Graves' disease patients. *J Clin Transl Endocrinol*. 2019; 15: 65–9.
26. Zhang YT, Liu J, Zhou YX. Pilot study on cryogenic heat transfer in biological tissues embedded with large blood vessels. *Forschung Im Ingenieurwesen*. 2002; 67(5): 188–97.
11. Khaziyev VV, Tjazelova OV, Makedonskaya VA. Sonographic changes in structure and volume of thyroid gland after local intrasurgical cryoexposure in patients with nodular euthyroid goiter. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2013; 23 (3): 240–6.
12. Kim C, O'Rourke AP, Mahvi DM, et al. Finite-element analysis of ex vivo and in vivo hepatic cryoablation. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2007; 54(7): 1177–85.
13. Korzhevskij DE, Gilyarov AV. *Osnovi Gistologicheskoy Tekhniki*. [Fundamentals of Histological Technique]. St. Petersburg: SpecLit, 2015. 807 p. Russian.
14. Laezza C, Mazziotti G, Fiorentino L, et al. HMG-CoA reductase inhibitors inhibit rat propylthiouracil-induced goiter by modulating the ras-MAPK pathway. *Mol Med (Berl)*. 2006; 84 (11): 967–73.
15. Morelli F, Sacrini A, Pompili G, et al. Microwave ablation for thyroid nodules: a new string to the bow for percutaneous treatments? *Gland Surg*. 2016; 5(6): 553–8.
16. Pobelensky KO, Kolot NV, Protsenko ES, et al. [Dynamics of morphological parameters of the thyroid gland in hypertensive SHR rats upon administration of propylthiouracil]. *Morphologia*. 2019; 13 (3): 93–8. Ukrainian.
17. Polychronakos C, Guyda HJ, Patel B, et al. Increase in the number of type II insulin-like growth factor receptors during propylthiouracil-induced hyperplasia in the rat thyroid. *Endocrinology*. 1986; 119 (3): 1204–9.
18. Pomorski L, Bartos M, Amsolik M, et al. Thyroid cryotherapy in an experimental rat model-topography of temperature during therapy and functional results. *Cryobiology*. 2000; 41 (1): 51–7.
19. Pomorski L, Bartos M, Matejkowska M, et al. Thyroid cryotherapy in an experimental rat model. *Cryobiology*. 1999; 39 (3): 262–70.
20. Rognoni JB, Penel C, Bastiani P, et al. Involution of hyperplastic goitre in the adult male rat. Tissue compartment process with early iodide effect: a stereological and biochemical study. *Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1987; 53 (3): 166–75.
21. Sabel MS. Cryo-immunology: A review of the literature and proposed mechanisms for stimulatory versus suppressive immune responses. *Cryobiology*. 2009; 58 (1): 1–11.
22. Tegler L, Gillquist J, Anderberg B, Lundström B, Johansson H. Thyroid blood flow rate in man. Electromagnetic flowmetry during operation in euthyroid normal gland, nontoxic goiter, and hyperthyroidism. *J Endocrinol Invest*. 1981; 4(3): 335–41.
23. Valcavi R, Frasoldati A. Ultrasound-guided percutaneous ethanol injection therapy in thyroid cystic nodules. *Endocr Pract*. 2004; 10 (3): 269–75.
24. Valcavi R, Riganti F, Bertani A, et al. Percutaneous laser ablation of cold benign thyroid nodules: a 3-year follow-up study in 122 patients. *Thyroid*. 2010; 20 (11):1253–61.
25. Vita R, Di Bari F, Perelli S, et al. Thyroid vascularization is an important ultrasonographic parameter in untreated Graves' disease patients. *J Clin Transl Endocrinol*. 2019;15: 65–9.
26. Zhang YT, Liu J, Zhou YX. Pilot study on cryogenic heat transfer in biological tissues embedded with large blood vessels. *Forschung Im Ingenieurwesen*. 2002; 67(5): 188–97.

