

## ПРОБЛЕМИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ КРІОТЕХНОЛОГІЙ В НЕЙРООНКОЛОГІЇ

Дяченко М.І.

Медичний інститут

Сумського державного університету

Клименко М.М., Доманський С.В., Санкін Ю.Ю.

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

Нечаєв І.Г.

Запорізький державний медичний університет

Розглядається історія та сучасні можливості застосування наднизьких температур в нейроонкології та нейрохірургії. Висвітлюються можливості сучасного контролю за процесами кровопливу та перспективні методи. Розглянуто основні механізми кровопливу на клітину, тканину і судинне русло, різні параметри кріодеструкції, а також технічні фактори, які можуть вплинути на результат кріодеструкції. Висвітлено питання кріоімунологічних механізмів.

**Ключові слова:** кріохірургія, кріодеструкція, кріоімунологія, механізми заморожування.

**Постановка проблеми.** Розуміння механізмів клітинного і тканинного кріопшкодження має велике значення, цим питанням займаються дослідники різних країн з середини минулого століття. Початкові уявлення про холодові термодеструкції склалися з двох механізмів: пряме пошкодження клітин кристалами льоду і порушення мікроциркуляції внаслідок судинного стазу після відтавання. На сьогодні розглядаються кілька аспектів механізму кріодеструкції: на молекулярному, клітинному і тканинному рівнях, а також технічні характеристики кровопливу [1].

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** Розвиток інтраопераційних методів нейровізуалізації слугував причиною сплеску інтересу до кріохірургії в кінці 90-х рр. ХХ століття [2]. Розробки нових кріоприладів [2] і методик інтраопераційного контролю за кровопливом [3] дозволили ефективно видаляти пухлини головного і спинного мозку, запобігати крововтраті при видаленні високо васкуляризованої пухлини [4].

У 2005-2006 рр. з'явилися роботи по використанню методу електричної імпеданс-томографії для контролю за процесом формування крижаної кулі в головному мозку [5].

У 2009 р в Китаї на кафедрі біомедичної інженерії запропонували нову стратегію в кріохірургії, так звану нанокріохірургію для поліпшення ефективності заморожування тканин і запобігання ураження здорових тканин [6].

**Виділення невирішених раніше частин загальної проблеми.** На сьогодні накопичено значний досвід лікування, із застосуванням кріохірургічних методів, різних захворювань, включаючи передпухлинні та онкологічні. Незважаючи на велику кількість оперативних втручань з використанням кріотехнологій залишається багато невирішених питань, пов'язаних з перспективами застосування кріометодів в медицині.

**Формулювання цілей статті.** Робота є спробою аналізу і встановлення причин, що перешкоджають застосуванню кріохірургічних методів в нейроонкології, а також можливих шляхів їх подолання.

**Виклад основного матеріалу. Механізми пошкодження тканин при кріодеструкції.**

Кровоплив на клітку супроводжується денатурацією протеїну та зміною структури ліпідів, так як кріопшкодження призводять до критичної зміни електrolітичного балансу і рН [7]. При зниженні температури ліпіди переходять в тверду фазу гелю, ліпідний бішар втрачає зв'язок з протеїнами, що призводить до деградації плазматичної мембрани. Було відзначено, що денатурація протеїну в клітині після заморожування і відтавання при температурі до  $-20^{\circ}\text{C}$  мінімальна і значна в діапазоні до  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ці дані корелюють з температурами, які здатні «пережити» клітини [8].

На клітинному рівні кріотермічне пошкодження відбувається внаслідок утворення внутрішньоклітинного льоду [9]. Зростаючі кристали льоду механічно пошкоджують клітинні мембрани та органели, в результаті збільшення обсягу в порівнянні з водою в рідкій фазі. На клітинну загибель також впливають зміни електrolітичного балансу і рН, що призводить до осмотичного стресу до фази утворення внутрішньоклітинного льоду і після відтавання [10]. В період утворення позаклітинного льоду в клітині підвищується концентрація електrolітів через активний вихід води – клітина зневоднюється. А при відтаванні рідина спрямовується всередину клітини, що призводить до її набухання – осмотичного набряку [11]. Такі явища відбуваються на тлі деградації клітинної мембрани, яка не здатна протистояти осмотичному стресу.

Було виявлено, що в центральній частині крижаної кулі відбувається безпосередній некроз, а на периферії, де температури не досягають критичного рівня, включається апоптоз [12]. Механізм апоптозу посилюється в період від 2 до 8 годин після циклу заморожування-відтавання. Апоптозу піддаються клітини, що знаходяться за зоною тотального некрозу, проте чітких меж не виявлено [13].

На рівні тканин теж відбуваються значні зміни в процесі кріодеструкції. Основний механізм полягає в порушенні мікроциркуляції після відтавання [14]. Відразу після відтавання відбувається реперфузія замороженої тканини, що сприяє мі-

гравії в цю зону запальних клітин [15]. Судинний стаз розвивається протягом години після відігрівання тканин і призводить до вираженої ішемії раніше замороженої зони. Піддані кріовпливу ендотеліальні клітини капілярів стають набряклими, цілісність ендотеліального шару порушується, підвищується проникність капілярів, що призводить до агрегації тромбоцитів і тромбозу [16]. Саме пошкодження ендотелію при локальній кріодеструкції головного мозку є причиною порушення гематоенцефалічного бар'єру в цій зоні.

У кріодеструкції температурний фактор є визначальним. Н.В. Neel і співавт. відзначили, що заморожування в температурному діапазоні від 0 до  $-20^{\circ}\text{C}$  недостатньо для повного некрозу клітин, тим більше пухлинних. Для досягнення тотального некрозу в експериментах на тваринах ними встановлений діапазон температур від  $-40^{\circ}\text{C}$  до  $-60^{\circ}\text{C}$ . При цьому дані температури повинні бути досягнуті в усій замороженої зоні, де існують пухлинні клітини [17].

Швидкість заморожування – не менш важливий критерій. Ряд авторів дотримується концепції повільного зниження температури, для отримання максимального ефекту від осмотичного стресу. Більшість дослідників вважають, що заморожування має протікати з високою швидкістю [18]. Однак надшвидке охолодження призводить до утворення аморфного льоду, який не пошкоджує клітинні мембрани. Тривалість перебування тканини в замороженому стані також має значення, так як зі збільшенням часу перебування води в твердій фазі відбувається перекристалізація кристалів льоду [19]. Експериментально доведено, що чим довше існує крижана куля, тим більш виражена деструкція. Однак це має значення, тільки якщо температура знаходиться в межах від  $-10^{\circ}\text{C}$  до  $-25^{\circ}\text{C}$ , а при проведенні кріовпливу в режимах нижче  $-50^{\circ}\text{C}$  часовий фактор не має впливу [19].

Наступним і найбільш значущим критерієм є швидкість відтавання. Експериментально доведено, що форсоване відтавання підвищує шанси на виживання клітин, а повільне – сприяє деструкції. У період повільного підвищення температури відбувається максимальна перекристалізація льоду, що призводить до загибелі клітини [20].

Повторення циклів заморожування – відтавання сприяє надійності загибелі клітин. Відзначено, що при повторенні процедури кріодеструкції досягаються більш низькі температури за більш короткий час. Це явище пояснюється не тільки руйнуванням клітинних мембран і термоізоляційних структур. Слід враховувати також, що жива тканина, піддана замерзання відтавання, збільшує свою теплопровідність на 10-20%. Цей фактор сприяє повноті деструкції на периферії раніше замороженої тканини, що дуже актуально при кріовпливі на пухлину. На кордоні крижаної кулі температура не досягає критичних значень (нижче  $-40^{\circ}\text{C}$ ), а значить, висока ймовірність збереження життєздатності клітин. Якщо тканина була одноразово піддана кріодеструкції в температурному діапазоні нижче  $-40^{\circ}\text{C}$ , то проведення повторних циклів вважається недоцільним.

#### Оптимальні фактори успіху кріодеструкції:

1. Висока швидкість охолодження тканини;

2. Мінімальна температура у вогнищі (максимальний ушкоджуючий ефект настає при зниженні температури до  $-40^{\circ}\text{C}$ );

3. Загальна тривалість експозиції даної температури (чим більше час експозиції, тим більш виражена деструкція в тканинах);

4. Швидкість відтавання (чим повільніше відбувається відтавання, тим ефективніша кріодеструкція);

5. Кількість циклів «заморожування-відтавання» (чим більше циклів, тим повніше руйнування клітин).

#### Кріохірургія та імунологія

На початку впровадження кріохірургічного методу в онкологію з'явилися повідомлення про регрес метастазів після заморожування основного пухлинного вогнища, що вказувало на потенційний вплив кріодеструкції на імунну систему [21]. Кілька окремих досліджень в той час відзначили збільшення неспецифічних маркерів імунної відповіді у пацієнтів, які перенесли кріодеструкцію при раку ротової порожнини [22], прямої кишки [23] і молочної залози [24].

На підставі цих досліджень було виявлено, що кріодеструкція може не тільки безпосередньо руйнувати пухлину, а й може викликати протипухлинну активацію імунної системи. Ця реакція була названа «кріоімунологічна відповідь» [25].

З інтенсивним розвитком імунології з'явилося більш чітке розуміння взаємовідносин між вродженою і набутою імунною відповіддю до кріохірургічного втручання.

S. Gazzanig і співавт. досліджували лінію людських клітин меланоми мишей, де провели в найближчі години і дні оцінку змін рівня імунних клітин, переважно макрофагів, як зрілих, так і наївних. Вони відзначили, що через кілька годин після кріовпливу відбувається міграція клітин в перитуморальну область. Максимальна концентрація відзначається від 3-х до 15-ти діб з піком на 7-му добу. Крім того, відзначено підвищення рівня антимеланомних антитіл [27].

M.S. Sadel і співавт. досліджували аденокарциному молочної залози у мишей. Після звичайної хірургічної резекції сприйнятливість мишей до повторної імплантації клітин аденокарциноми становила 86%, а після кріодеструкції – всього 16%. При цьому сприйнятливості до інших пухлин не змінювалася. Було відзначено підвищення прозапальних цитокінів інтерлейкіну 12 (IL-12) та інтерферону гамма (IFN-гамма) після кріовпливу. Крім того, дослідники виявили підвищення активності клітин натуральних кілерів (NK) [26].

Den Brok і співавт. виявили, що кріовплив призводить до дозрівання дендритних клітин (DC) до антиген-презентуючих клітин, що викликає індукцію специфічної імунної відповіді [27].

M.H. Ravindranath і співавт. перевірили рівень пухлинних гангліозидів в сироватці крові і титр антитіл до них після кріовпливу. В результаті дослідження виявилось, що некроз пухлини після кріодеструкції призводить до вивільнення пухлинних гангліозидів в кров і є ад'ювантом гуморальної імунної відповіді. При цьому введення гангліозидів в кров без кріовпливу не сприяє появі гуморальної імунної відповіді [28].

Однак ряд авторів відзначає, що кріовплив індукує пригнічення імунної відповіді, так як ви-

являлося підвищення рівня Т-супресорів (на сьогодні прийнято їх називати Т-регуляторні клітини) [29].

С. Hanawa при дослідженнях на мишах з пухлинами в печінці виявили, що при тотальній кріодеструкції пухлини щури менш стійкі до повторної імплантації пухлини, ніж щури з частковою кріодеструкцією пухлинного вогнища, при цьому в першій групі щурів тривалість життя була менше [30]. Таким чином, ймовірно повнота і радикальність кріодеструкції може модулювати імунну відповідь.

Природа імунної відповіді залежить від того, які цитокіни вивільнюються.

Деякі пухлини здатні синтезувати і вивільняти запальні цитокіни (інтерлейкін 10 (IL-10), фактор росту пухлини бета (TGF-Бетт)), які чинять імуносупресивну дію. Вихід протизапальних цитокінів після кріодеструкції може активувати Т-регуляторні клітини, які пригнічують презентацію антигенів, і це призводить до імуносупресії. Якщо після кровопливу наростає рівень прозапальних цитокінів, то це є стимулом до активації імунної відповіді [31].

Кріоімунна відповідь залежить від механізму клітинної загибелі [32].

При некрозі викидаються імуностимулюючі прозапальні цитокіни, ДНК, РНК [33]. Імунна система активується на масивну клітинну загибель. Багато дослідників показали, що некроз призводить до дозрівання дендритних клітин і активації макрофагів. Апоптоз не викликає активного запалення, так як не відбувається викиду імуностимулюючих речовин.

Макрофаги, які мігрують в зону кріодеструкції, можуть ініціювати гуморальну відповідь, а проникнення дендритних клітин і їх дозрівання до антиген-презентуючих клітин сприяє Т-клітинній ланці імунної відповіді [34].

**Висновки та перспективи.** Таким чином, аналіз світової літератури показує, що можливості кріохірургії ще недостатньо оцінені. Останні досягнення в області ультранеїросонографії і нейровізуалізації в поєднанні із застосуванням модернізованих кріопріборів дозволять більш точно, якісно і малоінвазивно руйнувати внутрішньочерепні новоутворення складної локалізації. Необхідно більш глибоке комплексне вивчення проблеми, на новому технічному рівні, з використанням останніх досягнень діагностичних методів і методів інтраопераційного контролю зони кріодеструкції.

## Список літератури

1. Bischof J.C., He X. Thermal stability of proteins // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2005. – № 1066. – P. 12-33.
2. Chang Z., Finkelstein J.J., Ma H., Baust J. Development of a high-performance multiprobe cryosurgical device // *Biomedical instrumentation & technology.* – 1994. – Vol. 28. – № 5. – P. 383-390.
3. Mogami T., Dohi M., Harada J. A new image navigation system for MR-guided cryosurgery // *Magn Reson Med Sci. (Japan).* – 2002. – Vol. 1. – № 4. – P. 191-197.
4. Maroon J.C., Onik G., Quigley M.R., Bailes J.E. et al. Cryosurgery re-visited for the removal and destruction of brain, spinal and orbital tumours // *Neurological research.* – 1992. – Vol. 14. – № 4. – P. 294-302.
5. Gergel A., Zlochiver S., Rosenfeld M., Abboud S. Induced current bio-impedance technique for monitoring cryosurgery procedure in a two-dimensional head model using generalized coordinate systems // *IEEE transactions on bio-medical engineering.* – 2005. – Vol. 52. – № 7. – P. 1361-1365.
6. Liu J., Deng Z.S. Nano-cryosurgery: advances and challenges // *J Nanosci Nanotechnol.* – 2009. – Vol. 9. – № 8. – P. 4521-4542.
7. Bischof J.C., He X. Thermal stability of proteins // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2005. – № 1066. – P. 12-33.
8. Wolker W.F., Balasubramanian S.K., Ongstad E.L., Zec H.C., Bischof J.C. Effects of freezing on membranes and proteins in LNCaP prostate tumor cells // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2007. Vol. 1768. – P. 728-736.
9. Meryman H.T. Mechanics of freezing in living cells and tissues // *Science.* – 1956. – Vol. 124. – P. 515-521.
10. Mazur P. Causes of injury in frozen and thawed cells // *Fed Proc.* – 1965. – Vol. 24. – P. 175-182.
11. Lovelock J.E. The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing // *Biochim Biophys Acta.* – 1953. – № 10. – P. 414-426.
12. Steinbach J.P., Weissenberger J., Aguzzi A. Distinct phases of cryogenic tissue damage in the cerebral cortex of wild-type and c-fos deficient mice // *Neuropathol Appl Neurobiol.* – 1999. – № 25. – P. 468-480.
13. Wen J., Duan Y., Zou Y., Nie Z. et al. Cryoablation induces necrosis and apoptosis in lung adenocarcinoma in mice // *Technol Cancer Res Treat.* – 2007. – № 6. – P. 635- 640.
14. Gage A.A., Baust J. Mechanisms of tissue injury in cryosurgery // *Cryobiology.* – 1998. – № 37. – P. 171-186.
15. Rupp C.C., Hoffmann N.E., Schmidlin F.R. et al. Cryosurgical changes in the porcine kidney: histologic analysis with thermal history correlation // *Cryobiology.* – 2002. – Vol. 45. – P. 167-182.
16. Hoffmann N.E., Bischof J.C. The cryobiology of cryosurgical injury // *Urology.* – 2002. – Vol. 60. – P. 40-49.
17. Neel H.B., 3rd, Ketcham A.S., Hammond W.G. Requisites for successful cryogenic surgery of cancer // *Arch Surg.* – 1971. – Vol. 102. – P. 45-48.
18. Коченов В.И. Крїологическая профилактическая онкология. Ниж. Новгород. – 2003. – 92 с.
19. Mazur P. Physical-chemical factors underlying cell injury in cryosurgical freezing. In: *Cryosurgery*, Rand R.W., Tinfert A.P., Von Leden H. (eds). Thomas: Springfield, Illinois.: 1968; 32-51.
20. Neel H.B., 3rd, De Santo L.W. Cryosurgical control of cancer: effects of freeze rates, tumor temperatures, and ischemia // *Ann Otol Rhinol Laryngol.* – 1973. – 82. – P. 716-723.
21. Ablin R.J., Soanes W.A., Gonder M.J. Prospects for cryo-immunotherapy in cases of metastasizing carcinoma of the prostate // *Cryobiology.* – 1971.- № 8. – P. 271-279.
22. Eastham R.J., Mason J.M., Jennings B.R. et al. T-cell rosette test in squamous cell carcinoma of the head and neck // *Archives of Otolaryngology.* – 1976. – № 102.- P. 171-175.
23. Kogel H., Grundmann R., Fohlmeister I. et al. Cryotherapy of rectal cancer. Immunologic results. [German] // *Zentralblatt fur Chirurgie.* – 1985. – 110 (2-3). – P. 147-154.
24. Suzuki Y. Cryosurgical treatment of advanced breast cancer and cryoimmunological responses // *Skin Cancer.* – 1995. – № 10. – P. 19-26.

25. Sabel M.S. Cryo-immunology: A review of the literature and proposed mechanisms for stimulatory versus suppressive immune responses // *Cryobiology*. – 2009. – Vol. 58. – P. 1-11.
26. Sabel M.S., Nehs M.A., Su G. et al. Immunologic response to cryoablation of breast cancer // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2005. – Vol. 90. – № 1. – P. 97-104.
27. Den Brok M.H.M.G.M., Suttmuller R.P.M., Nierkens S. et al. Efficient loading of dendritic cells following cryo and radiofrequency ablation in combination with immune modulation induced anti-tumor immunity // *British Journal of Cancer*. – 2006. – № 95. – P. 896-905.
28. Ravindranath M.H., Wood T.F., Soh D. et al. Cryosurgical ablation of liver tumors in colon cancer patients increases the serum total ganglioside level and then selectively augments antiganglioside IgM // *Cryobiology*. – 2001. – Vol. 45. – P. 10-21.
29. Shibata T., Yamashita T., Suzuki K. et al. Enhancement of experimental pulmonary metastases and inhibition of subcutaneously transplanted tumor growth following cryosurgery // *Anticancer Research*. – 1998. – № 18. – P. 4443-4448.
30. Hanawa S. An experimental study on the induction of antitumor immunological activity after cryosurgery for liver carcinoma, and the effect of concomitant immunotherapy with OK432 // *Journal of the Japanese Surgical Society*. – 1993. – Vol. 94. – P. 57-65.
31. Seifert J.K., Stewart G.J., Hewitt P.M. et al. Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels following hepatic cryotherapy: association with volume and duration of freezing // *World Journal of Surgery*. – 1999. – № 23. – P. 1019-1026.
32. Sabel M.S. Cryo-immunology: A review of the literature and proposed mechanisms for stimulatory versus suppressive immune responses // *Cryobiology*. – 2009. – Vol. 58. – P. 1-11.
33. Skoberne M., Beignon A.S., Bhardwaj N. Danger signals: a time and space continuum // *Trends Mol. Med.* – 2004. – № 10. – P. 251-257.
34. Gazzaniga S., Bravo A., Goldszmid S.R. et al. Inflammatory changes after cryosurgery-induced necrosis in human melanoma xenografted in nude mice // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2001. – Vol. 116. – № 5. – P. 664-671.

**Дяченко М.И.**

Медицинский институт  
Сумского государственного университета

**Клименко М.Н., Доманский С.В., Санкин Ю.Ю.**

Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца

**Нечаев И.Г.**

Запорожский государственный медицинский университет

## ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КРИОТЕХНОЛОГИЙ В НЕЙРООНКОЛОГИИ

**Аннотация**

Рассматривается история и современные возможности применения ультранизких температур в нейроонкологии и нейрохирургии. Освещаются возможности современного контроля за процессом криовоздействия и перспективные методы. Рассмотрены основные механизмы криовоздействия на клетку, ткань и сосудистое русло, различные параметры криодеструкции, а также технические факторы, которые могут повлиять на результат криодеструкции. Освещен вопрос крио-иммунологических механизмов.

**Ключевые слова:** криохирургия, криодеструкция, крио-иммунология, механизмы замораживания.

**Dyachenko M.I.**

Medical Institute  
of the Sumy State University

**Klimenko M.N., Domanskiy S.V., Sankin Y.Y.**

Bogomolets National Medical University

**Nechaev I.G.**

Zaporizhzhia State Medical University

## PROBLEMS AND PROSPECTS OF KRIOTEHNOLOHIY IN NEUROONCOLOGY

**Summary**

There are considered modern possibilities of the usage of ultralow temperature in world neuro-oncology and neurosurgery. The cryotherapy control and its perspective methods are showed. Also there are reviewed main mechanisms of freezing influence on cells, tissues and vasculature, different parameters of cryo-destruction. This article reports about technical factors and possibilities of their influence on the result of cryo-destruction. Cryo-immunology mechanisms are included.

**Keywords:** cryosurgery, cryo-destruction, cryo-immunology, mechanisms of cryotherapy.