



О. І. Дронов,
І. О. Ковальська,
Є. С. Козачук,
П. П. Бакунець,
Н. Ю. Лук'янова

Національний медичний
університет імені
О. О. Богомольця, м. Київ

Інститут експериментальної
патології, онкології
і радіобіології імені
Р. Є. Кавецького НАН
України, м. Київ

© Колектив авторів

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ПОЄДНАНОГО ВПЛИВУ НАДНИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР ТА ЛОКАЛЬНОЇ ХІМІЧНОЇ ДЕСТРУКЦІЇ 10 % РОЗЧИНОМ КАЛЬЦІЮ ХЛОРИДУ НА МОДЕЛЬ КАРЦИНОСАРКОМИ ШТАМУ WALKER 256 У ЩУРІВ ЛІНІЇ WISTAR

Резюме. Мета дослідження було оцінити ефективність поєднаного впливу наднизських температур та інтратуморального введення 10% кальцію хлориду на модель карциносаркоми Walker-256 у щурів. Експериментальне дослідження виконано на 58 дорослих щурах-самицях лінії Wistar, яким було прищеплено штам карциносаркоми Walker-256 і розподілено на 4 групи в залежності від агенту деструктивного впливу. Оцінювали: об'єм змодельованої пухлини до впливу та на 4-ту, 8-му добу після втручання та ступінь вираженості деструктивних змін пухлин на 4-ту, 6-ту, 8-му добу. Попереднє інтратуморальне введення 10%CaCl₂ підвищує радикальність застосування кріодеструкції пухлинних вогнищ, шляхом збільшення деструктивних змін пухлинної тканини у найбільш віддалених від кріоаплікатора ділянках.

Ключові слова: кріодеструкція, 10 % розчин кальцію хлориду, карциносаркома walker-256, щурі лінії Wistar.

Вступ

Метод кріохірургічної деструкції відомий давно і широко використовується в багатьох світових клініках для лікування пацієнтів із вогнищевою патологією печінки [1]. Однак, незважаючи на всі переваги та досягнуті позитивні результати застосування кріодеструкції, актуальним залишається питання покращення її ефективності [2, 3, 4]. У зв'язку з чим, тривають спроби удосконалення кріохірургічного методу шляхом розробки методик потенціювання цитодеструктивного ефекту наднизських температур з метою підвищення радикальності втручання. Наприклад, повторення кріоциклів, введення в зону майбутнього кріовпливу розчинів лідокаїну, адреналіну, дистильованої води, створення попередньої ішемізації зони інтересу, застосування ультразвуку [2, 4]. На наш погляд, найбільш перспективним напрямком підвищення ефективності кріохірургічного методу є розробка способів збільшення зони некротичних змін в патологічному субстраті шляхом поєднання дії наднизських температур та хімічних агентів.

Мета дослідження

Оцінити ефективність поєднаного впливу наднизських температур та інтратуморального введення 10% кальцію хлориду на модель карциносаркоми Walker-256 у щурів.

Матеріали та методи досліджень

Дослідження виконали на базі Інституту експериментальної патології, онкології і радіо-

біології імені Р.Є.Кавецького НАН України на 58 дорослих щурах-самицях лінії Wistar. Вага тварин становила всередньому 224-268г. Всім піддослідним тваринам було перещеплено штам карциносаркоми Walker-256.

На 8-му добу після перещеплення пухлини тварин випадковим чином поділили на 4 піддослідні групи.

I група (n=10) — група порівняння — тварини з перевитими клітинами карциносаркоми штаму Walker-256 зі «спонтанним розвитком пухлини» без будь-якого впливу на змодельовану пухлину.

II група (n=16) — тварини з перевитими клітинами карциносаркоми штаму Walker-256 із кріоабляцією змодельованої пухлини.

III група (n=16) — тварини з перевитими клітинами карциносаркоми штаму Walker-256 із інтратуморальним введенням 10% кальцію хлориду.

IV група (n=16) — тварини, яким виконано комбіновану кріохімічну деструкцію змодельованої пухлини.

Оцінювали:

1. Об'єм змодельованої пухлини до впливу та після втручання в контрольні терміни — 4 та 8 доба.

2. Ступінь вираженості цитодеструктивного ефекту в контрольні терміни після деструкції — 4, 6, 8 доба.

Модельовання пухлини виконували шляхом підшкірної ін'єкції 1,0 мл 20% суспензії клітин карциносаркоми Walker-256 в ділянку зовнішньої поверхні правого стегна щура. Пухлинні

клітини в місці ін'єкції прижились у вигляді формування пухлинного вузла на 8-му добу у всіх тварин.

Кріодеструкцію перешепленої пухлини виконували за допомогою кріоінструменту оригінальної конструкції, розробленого в Інституті фізики АН УРСР. Кріоагент — рідкий азот (-180 °С). Аплікатор кріоінструменту щільно притискали до центру пухлини, після чого налагоджували безперервне охолодження поверхні аплікатора, впродовж часу експозиції — 10 хвилин. Діаметер кріоаплікатора становив — 0,6 см.

Ін'єкції 10 % CaCl₂ виконували інтратуморально. Дозу препарату для інтратуморального введення розраховували за формулою, прийнятою для розрахунку дози 96 % розчину етанолу при алкоголізації пухлин печінки:

$$V = 4/3\pi(r + 0,5)^3, \quad (1)$$

де: V — доза препарату, що вводиться, мл;

r — радіус вогнища в найбільшому вимірі, см;

0,5 — коефіцієнт для більшої радикальності ефекту.

Інтратуморальне введення здійснювали повільно впродовж 5 хвилин, шляхом обколювання пухлинного вузла, інфільтруючи тканини пухлини від поверхні вглиб.

Методика комбінованої кріохімічної деструкції полягала у тому, що спочатку виконували ін'єкцію 10 % CaCl₂ і через 5,0 хвилин після закінчення введення виконували кріодеструкцію.

Розрахунок об'єму пухлинних вузлів здійснювали за загальноприйнятою формулою розрахунку об'єму еліпсоїда в мм³.

Забір макропрепаратів для гістологічного дослідження проводили відразу після евтаназії тварин. Приготування гістологічних препаратів для мікроскопічного дослідження здійснювали за загальноприйнятою методикою. Забарвлення препаратів — гематоксиліном і еозином. Для фотодокументування мікропрепаратів використовували мікроскоп MICROS MC300 (XT) (Австрія), цифрову камеру TourCam 5,1M UHCCD C-Mount Sony, адаптер Adapter AMA075 в програмі TourTek TourView (V3.7. 1398).

Утримування і догляд за щурами, а також всі маніпуляції на них проводили відповідно до державних і міжнародних стандартів гуманного ставлення до тварин — основних

положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (1986) і не суперечать основним біоетичним нормам Гельсінкської декларації, прийнятої Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації, Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину (1977), з відповідними положеннями ВООЗ, Міжнародним радам медичних товариств, Міжнародного кодексу медичної етики (1983) і законам України.

Дослідження проведено в рамках науково-дослідної роботи «Застосування кріохірургічних технологій в комплексному лікуванні пухлин гепатопанкреатодуоденальної зони», № держреєстрації 616.37-089-085.832, що виконується на кафедрі загальної хірургії №1 і фінансується МОЗ України.

Статистичну обробку даних виконували за допомогою програмного забезпечення IBM SPSS Statistics Version 23.0. Середні значення показників вказували як $M \pm m$, де M — середнє, m — стандартна похибка. Враховуючи малий об'єм вибірок, для множинного порівняння отриманих результатів в досліджуваних групах використовували ранговий однофакторний аналіз Крускала — Уолліса. Статистично значимим вважали показники, що відповідали $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

Середні значення об'ємів змодельованих пухлин в контрольні строки наведено в табл.1.

Як видно з табл. 1, в I групі тварин із спонтанним розвитком пухлин відмічалась тенденція до збільшення їх розмірів і, навпаки, зменшення об'ємів утворень в II-IV групах в контрольні терміни після застосування деструктивних агентів. При чому, в I, II та III групах статистично значимої різниці між початковими об'ємами пухлин в порівнянні з такими на 4-ту та 8-му добу не виявлено ($p=0,336$, $p=0,054$, $p=0,06$ відповідно). Однак у IV групі, де застосовували поєднання кріота хімічної деструкції, на 8-му добу відмічали достовірне зменшення розмірів карциносаркоми Walker-256 порівняно з початковим об'ємом пухлин ($p < 0,001$).

До початку впливу досліджуваних агентів деструкції на карциносаркому Walker-256 статистично значимої різниці між групами піддо-

Таблиця 1

Середні значення об'ємів (мм³) пухлинних вузлів в досліджуваних групах в контрольні терміни після деструкції

Доба	Група			
	I, n=10	II, n=16	III, n=16	IV, n=16
До впливу	338,6±28,8	305,02±24,5	295,3±23,5	289,5±23,3
4	363,8 ± 28,5	252,1 ± 24,63	294,2 ± 21,5	138,2 ± 11,01
8	394,1 ± 30,5	250,2 ± 15,39	276,1 ± 20,29	68,92 ± 2,69



слідних тварин за об'ємом пухлинних вузлів не виявлено ($p=0,551$). На 4-ту добу після втручання середній об'єм пухлин в досліджуваних групах становив: $(363,8 \pm 28,5)$ мм³, $(252,1 \pm 24,63)$ мм³, $(294,2 \pm 21,5)$ мм³ та $(138,2 \pm 11,01)$ мм³ відповідно. Порівняно з I групою статистично значимої різниці у зменшенні середніх об'ємів пухлин на 4-ту добу після деструкції в II та III піддослідних групах не спостерігали ($p>0,05$), але встановлено достовірне зменшення розмірів пухлинних вузлів в групі поєданого впливу в порівнянні з I та II групою ($p<0,01$) і III групою на рівні $p<0,05$. Середні значення об'ємів змодельованих пухлин на 8-му добу спостереження в I групі становили — $(394,1 \pm 30,5)$ мм³, у II — $(250,2 \pm 15,39)$ мм³, III — $(276,1 \pm 20,29)$ мм³ та у IV — $(68,92 \pm 2,69)$ мм³. У зазначений термін статистичної різниці за даними показниками не виявлено між I та III групою і II та III групою ($p>0,05$), проте виявлено достовірні відмінності між I і II групою ($p<0,05$), I і III ($p<0,01$), II і IV ($p<0,05$) та III і IV групами на рівні $p<0,01$.

Визначення відсотку площі деструктивних змін змодельованої пухлини досліджували в II, III та IV піддослідних групах.

Узагальнення середніх значень відсотків площ некротичних та некробіотичних змін пухлин на 4-ту, 6-ту та 8-му добу наведено в таблиці 2.

Ступінь вираженості некротичних та некробіотичних змін в пухлинних вузлах на 4-ту добу після кріогенного впливу становив в середньому $(45,33 \pm 2,28)$ % та $(9,31 \pm 0,32)$ % відповідно, після інтратуморального введення 10 % CaCl₂ — $(23,64 \pm 2,24)$ % та $(20,68 \pm 0,84)$ %, після комбінованого впливу — $(63,53 \pm 1,72)$ % і $(17,50 \pm 0,48)$ % від загальної кількості гістологічних зрізів. Некротичні та некробіотичні зміни пухлинної тканини на 6-ту добу після кріодеструкції становили в середньому $(51,77 \pm 2,26)$ % і $(6,76 \pm 0,24)$ %, внаслідок хімічної абляції 10 % CaCl₂ — $(34,17 \pm 1,82)$ % та $(16,40 \pm 0,67)$ %, комбінованої деструкції — $(73,61 \pm 1,68)$ % та $(10,38 \pm 0,43)$ % від загальної площі гістологічних зрізів. Через 8 діб після

кріогенного впливу на пухлинну модель відсоток некротичних змін становив всередньому $(61,54 \pm 2,41)$ %, некробіотичних — $(2,93 \pm 0,18)$ %. Внаслідок внутрішньопухлинного введення 10 % CaCl₂ середні відсотки деструктивних змін у зазначений термін відповідали $(48,05 \pm 2,09)$ % — некроз і $(11,53 \pm 0,50)$ % — некробіоз. Комбінація пошкоджуючих агентів спричинила $(83,65 \pm 1,37)$ % некрозу та $(6,41 \pm 0,65)$ % некробіозу.

Динаміка розвитку деструкції пухлинних вузлів в II–IV групах досліджуваних тварин характеризувалась тенденцією до збільшення відсотку некротичних змін та зменшення відсотку площі некробіотичних змін, за рахунок яких відбувалось наростання площі специфічної деструкції.

При статистичному аналізі ступеню вираженості деструктивних змін карциносаркоми Walker-256 в результаті пошкоджуючого впливу досліджуваних факторів на 4-ту, 6-ту та 8-му добу виявлено, що в результаті поєданого застосування кріо-хімічної деструкції відсоток площі некротичних змін був достовірно вищим в порівнянні з кріодеструкцією та інтратуморальним введенням 10% кальцію хлориду ($p<0,05$). Статистично значимої різниці між відсотком площі некрозів в II та III групах в контрольні терміни не виявлено ($p>0,05$). Також встановлено, що відсоток площі некробіотичних змін був достовірно вищим в III та IV групі порівняно з II групою ($p<0,05$). Статистично значимої різниці між III та IV групою за ступенем розповсюдження некробіозу не встановлено ($p>0,05$).

Висновки

1. Поєдане застосування кріогенної деструкції та інтратуморального введення 10 % CaCl₂ призводило до достовірного зменшення об'єму карциносаркоми Walker-256 та збільшення відсотку площі некротичних змін в динаміці порівняно з ізольованим впливом наднизьких температур та хімічної деструкції 10 % CaCl₂, що може свідчити про потенціуючий вплив

Таблиця 2

Середні значення деструкції (%)^{*} пухлинних вузлів в досліджуваних групах в контрольні терміни після деструкції

Доба	Зміни	Група		
		II n=10	III n=10	IV n=10
4	Некроз	35,33 ± 2,28	13,64 ± 2,24	53,53 ± 1,72
	Некробіоз	9,31 ± 0,32	20,68 ± 0,84	17,50 ± 0,48
6	Некроз	41,77 ± 2,26	21,17 ± 1,82	79,61 ± 1,68
	Некробіоз	6,76 ± 0,24	16,40 ± 0,67	10,38 ± 0,43
8	Некроз	51,54 ± 2,41	38,05 ± 2,09	91,65 ± 1,37
	Некробіоз	2,93 ± 0,17	11,53 ± 0,50	6,41 ± 0,65

Примітка. * від загальної площі всіх досліджених зрізів.

інтратуморального введення 10 % CaCl₂ на цито-
деструктивний ефект наднизьких температур.

2. Попереднє інтратуморальне введення
10 % CaCl₂ підвищує радикальність засто-

сування кріодеструкції пухлинних вогнищ,
шляхом збільшення деструктивних змін пух-
линної тканини у найбільш віддалених від
кріоаплікатора ділянках.

ЛІТЕРАТУРА

1. Опыт применения криохирургического метода в ком-
плексном лечении пациентов з очаговой патологией
печени / А. И. Дронов [и др.] // Хирургия. Восточная
Европа. — 2018. — Vol. 7, № 1. — С. 8–12
2. Temperature Changes During Cryoeffect Potentiated With
Distilled Water Assessed in Porcine Liver Model Without
Splanchnic Blood Flow / A. I. Dronov [et al.] // Probl
Cryobiol Cryomed, 2017. — Vol. 27 (4). — P. 348-350 ([http://
cryo.org.ua/journal/index.php/problcryobiolcryomed/
issue/view/4-2017](http://cryo.org.ua/journal/index.php/problcryobiolcryomed/issue/view/4-2017))
3. Термометрия процесса локального криовоздействия
в биологической ткани на дискретных глубинах: раз-
работка комплекса измерительного интраопераци-
онного термодатчика четырехканального (КИИТ-4)
/ А. И. Дронов, И. А. Ковальская, Д. И. Хоменко
[и др.] // Хирургия. Восточная Европа. — 2018. — Vol. 7,
№ 1. — С. 21-27
4. Механизмы разрушения биологических тканей при
локальном криовоздействии/ В. В. Шафранов [и др.]
// Вестник РАЕН. — 2012. — № 1. — С. 68–77.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ СОЧЕТАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ СВЕРХНИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР И ЛОКАЛЬНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ДЕСТРУКЦИИ 10% РАСТВОРОМ КАЛЬЦИЯ ХЛОРИДА НА МОДЕЛЬ КАРЦИНОСАРКОМЫ ШТАММА WALKER-256 У КРЫС ЛИНИИ WISTAR

*О. И. Дронов,
И. О. Ковальська,
Е. С. Козачук, П. П. Бакунець,
Н. Ю. Лукьянова*

EXPERIMENTAL STUDY OF EFFICIENCY COMBINED INFLUENCE OF LOW TEMPERATURES AND LOCAL CHEMICAL DESTRUCTION WITH 10% SOLUTION CALCIUM CHLORIDE TO MODEL CARCINOSARCOMA STRAIN WALKER-256 IN WISTAR LINE RATS

*O. I. Dronov, I. O. Kovalska,
Ye. S. Kozachuk,
N. Yu. Lukyanova,
P. P. Bakunets*

Резюме. Целью исследования было оценить эффективность
сочетанного воздействия сверхнизких температур и интрату-
морального введение 10 % кальция хлорида на модель карци-
носаркомы Walker-256 у крыс. Экспериментальное исследова-
ние выполнено на 58 взрослых крысах-самках линии Wistar,
которым было привито штамм карциносаркомы Walker-256
и распределены на 4 группы в зависимости от агента деструк-
тивного воздействия. Оценивали: объем смоделированной
опухоли до воздействия и на 4-е, 8-е сутки после вмеша-
тельства; степень выраженности деструктивных изменений опу-
холей на 4-ю, 6-ю, 8-е сутки. Предварительное интратуморальне
введение 10 % CaCl₂ повышает радикальность применения
криодеструкции опухолевых очагов, путем увеличения де-
структивных изменений опухолевой ткани в наиболее удален-
ных от криоаплікатора участках.

Ключевые слова: криодеструкция, 10 % раствор кальция хло-
рида, карциносаркома walker-256, крысы линии Wistar.

Summary. The aim of the research was evaluation of efficiency
combined influence of low temperatures and local chemical destruc-
tion with 10 % solution calcium chloride to model carcinosarcoma
strain Walker-256 in Wistar line rats. An experimental study was
performed on 58 adult Wistar female rats, who were implanted with
the carcinosarcoma strain Walker-256 and divided into 4 groups de-
pending on the agent of destructive effect. Evaluated: the volume of
the modeled tumor for effect and on the 4th, 8th day after interven-
tion and the degree of severity of destructive tumor changes on the
4th, 6th, 8th day. Preliminary intratumoral injection of 10 % CaCl₂
increases effectiveness of tumorous lesions cryodestruction.

Key words: cryodestruction, 10% solution of calcium chloride, carci-
nosarcoma Walker-256, rat of the Wistar line.