

# Исследование влияния криодеструкции и криодеструкции с озонированием солидных опухолей, индуцированных клетками карциномы Эрлиха на выживаемость мышей, а также на продукцию ключевого цитокина TNF- $\alpha$

Е.Г. Новоселова

Институт биофизики клетки РАН

Цель исследования – сравнить эффективность криодеструкции (в атмосферном воздухе), криодеструкции при непосредственном воздействии жидкого азота (метод криоорошения с использованием губчатого материала) и криодеструкции с озонированием солидных злокачественных опухолей у мышей.

*Эксперименты с использованием нематастазирующей опухоли.*

Эксперимент №1. 08.04.2010. Использовали 29 мышей-самцов линии *Balb*, у которых был инициирован опухолевый рост путем подкожного введения  $10^6$  клеток асцитной карциномы Эрлиха в область задней лапы. Мышей разделили на 3 группы по 8, 10 и 11 особей, при этом **первая** группа не подвергалась никакому лечению (**Контроль**), солидные опухоли у 10 мышей **2-й группы** подвергались криодеструкции путем воздействия на опухоли непосредственно жидкого азота методом криоорошения (**Азот**), опухоли мышей **3-й группы** подвергались криодеструкции с озонированием методом криоорошения (**Кислород**). Понятно, что это условные обозначения, поскольку в обеих методиках криогенная жидкость содержит атомарный кислород.

*Условия эксперимента:* криохирургическое воздействие на опухоли мышей экспериментальных групп (**группа 2-я и группа 3-я**) проводили при воздействии 10-ти капель жидкого азота и жидкого кислорода, соответственно. Количество капель было подобрано предварительно с использованием здоровых мышей. Было установлено, что воздействие на лапу 15 капель жидкого кислорода или азота приводило к разрушению конечностей и гибели мышей.

*Сроки и частота проведения криодеструкции.* Операции проводили дважды – на 12-й и 15-й дни после начала опухолевого роста.

Регистрировали выживаемость мышей в течение 2-х месяцев.

Промежуточные результаты на 37-й день после начала опухолевого роста: (14.05)

Таблица 1. Относительная скорость роста опухолей по экспериментальным группам (37 день после инициации опухолевого роста)

Группа	Контроль	Азот	Кислород
Количество мышей с «большими» опухолями	6 (из 8-ми)	5 (из 10-ти)	6 (из 11-ти )
Процент выхода «больших опухолей»	75%	50%	54%

Промежуточные результаты на 47-й день после начала опухолевого роста: (24.05)

Таблица 2. Относительная скорость роста опухолей по экспериментальным группам (37 день после инициации опухолевого роста)

Группа	Контроль	Азот	Кислород
Количество мышей с «большими» опухолями	6 (из 8-ми)	6 (из 10-ти)	6 (из 11-ти )
Процент выхода «больших опухолей»	75%	60%	54%

Животных наблюдали в течение двух месяцев, до 08.06.2010

**РЕЗУЛЬТАТЫ эксперимента № 1 от 08.04.2010:**

Табл. 3. Выживаемость мышей-опухоленосителей при использовании разных способов криохирургии

Группа	Контроль	Азот	Кислород
Количество животных, погибших за 2 месяца	6 (из 8-ми)	5 (из 10-ти)	5 (из 11-ти )
Выживаемость, в %	25%	50%	54%

Табл. 4. Средняя продолжительность жизни мышей-опухоленосителей при использовании разных способов криохирургии

Группа	Контроль	Азот	Кислород
Средняя продолжительность жизни, дни	35,5±5.2	*48± 6.8	*55± 5.8

\* - достоверное отличие от контроля, P<0.05

**Эксперимент № 2.** 26.04.2010. Использовали 30 мышей-самцов линии *Balb*, у которых был инициирован опухолевый рост путем введения  $10^6$  клеток асцитной карциномы Эрлиха в область задней лапы подкожно. Мышей разделили на 3 группы по 10 особей, при этом **первая** группа не подвергалась никакому лечению (**Контроль**), солидные опухоли у 10 мышей **2-й группы** подвергались криодеструкции путем воздействия на опухоли криоаппликатора (**КАП**), опухоли мышей **3-й группы** подвергались криодеструкции с озонированием методом криоорошения (**Кислород**).

*Условия эксперимента:* криохирургическое воздействие на опухоли мышей экспериментальных групп (**группа 2-я и группа 3-я**) проводили при воздействии криоаппликатора в течение 15 секунд или 10-ти капель жидкого кислорода, соответственно.

*Сроки и частота проведения криодеструкции.* Операции проводили **трижды** – на 10-й, 15-й и на 22-й дни после начала опухолевого роста.

Регистрировали выживаемость мышей в течение 2-х месяцев.

Промежуточные результаты на 28-й день после инициации опухолевого роста (24.05.2010)

Таблица 3. Относительная скорость роста опухолей по экспериментальным группам (35-й день после инициации опухолевого роста)

Группа	Контроль	КАП	Кислород
Количество мышей с «большими» опухолями	6 из 10-ти	3 из 10	4 из 10
Процент выхода «больших опухолей»	60%	30%	40%

Животных наблюдали в течение двух месяцев, до 26.06.2010

## РЕЗУЛЬТАТЫ эксперимента № 2 от 26.04.2010

Табл. 5. Выживаемость мышей-опухоленосителей при использовании разных способов криохирургии

Группа	Контроль	Азот	Кислород
Количество животных, погибших за 2 месяца	7 (из 10-ми)	4 (из 10-ти)	3 (из 10-ти )
Выживаемость, в %	30%	60%	70%

Табл. 6. Средняя продолжительность жизни мышей-опухоленосителей при использовании разных способов криохирургии

Группа	Контроль	Азот	Кислород
Средняя продолжительность жизни, дни	36,6±5.2	*48± 6.8	*58± 5.8

\* - достоверное отличие от контроля, P<0.05

Эксперимент № 3. 30.04.2010. Использовали 20 мышей-самцов линии *Valb*, у которых был инициирован опухолевый рост путем введения  $10^6$  клеток асцитной карциномы Эрлиха в область задней лапы подкожно. Мышей разделили на 3 группы по 7, 6 и 6 особей, при этом **первая** группа не подвергалась никакому лечению (**Контроль**), солидные опухоли у 10 мышей **2-й группы** подвергались криодеструкции путем воздействия на опухоли криоаппликатора (**КАП**), опухоли мышей **3-й группы** подвергались криодеструкции с озонированием (**Кислород**).

*Условия эксперимента:* криохирургическое воздействие на опухоли мышей экспериментальных групп (**группа 2-я и группа 3-я**) проводили при воздействии криоаппликатора в течение 15 секунд или 10-ти капель жидкого кислорода, соответственно..

*Сроки и частота проведения криодеструкции.* Операции проводили **дважды** – на 11-й и 17-й дни после начала опухолевого роста.

*Сроки проведения измерений иммунного статуса.* Для выяснения динамики изменения иммунного статуса у контрольных и мышей и животных, подвергнутых криовоздействию, на 12-й, 18-й и на 25-й дни животных забивали, у них забирали кровь и селезенку, выделяли плазму и лимфоциты селезенки, образцы хранили при -70 °С до

проведения измерений (продукции TNF- $\alpha$  и индуцибельного белка теплового шока Hsp72).

**Заключение:** На основании полученных данных можно заключить, что криовоздействие на солидные опухоли, индуцированные раковыми клетками, оказывает очевидный терапевтический эффект. На стадии развития неместазирующих опухолей, индуцированных клетками карциномы Эрлиха, установлено, что опухолевый рост тормозился у групп мышей, опухоли которых были подвергнуты криовоздействию (криоорошению или криоаппликации). Всего в экспериментах было использовано 80 животных, при этом гибель контрольных мышей (не подвергавшихся криовоздействию) начиналась значительно раньше (примерно на 10 дней), чем гибель животных из опытных групп. Такое торможение опухолевого роста при использовании криотерапии отражалось также на общем физиологическом состоянии животных. Так, группы животных с экспериментальными опухолями, которых подвергали криовоздействию, потребляли больше пищи, их двигательная активность была выше, а шерсть была более гладкой в сравнении с мышами, не получавшими лечения.

По истечении срока наблюдения за динамикой гибели животных в течение 2-х месяцев было показано, что выживаемость животных, получавших криолечение, достоверно выше, чем выживаемость контрольных групп, при этом эффективность лечения была выше в том эксперименте, в котором использовали 3-х кратную процедуру криовоздействия (сравнить данные Табл. 3 с данными из Табл. 5). При 3-х кратном цикле криотерапии эффективность криодеструкции опухолей с озонированием была выше, чем действие криодеструкции без озонирования. Разные способы криолечения вызывали также достоверное увеличение средней продолжительности жизни животных, по этому показателю пока не выявлено достоверных различий при использовании разных способов криодеструкции солидных опухолей.

Таким образом, установлено, что 2-х и 3-х кратная криодеструкция солидных опухолей на первой и последующих стадиях роста злокачественных новообразований вызывает терапевтический эффект, приводящий к увеличению выживаемости и продолжительности жизни мышей с экспериментальными опухолями. Получены предварительные данные о возможности увеличения эффективности лечения путем увеличения кратности применения криодеструкции, а также при использовании процедуры озонирования.