

Перспективы исследования механизмов и последствий криодеструкции при использовании различных животных моделей

Обоснованием для распространения метода криохирургии в различных областях клинической медицины послужили анестезирующий, гемостатический, коагулирующий, антисептический, абластический и другие эффекты криовоздействия, а также возможность контроля за объемом разрушаемой ткани. Теоретической основой воздействия низких температур на биологические объекты являются физические процессы замерзания воды— основного компонента клеточных структур всех живых организмов. Однако замораживание живой ткани существенно отличается от замерзания воды. Процесс образования кристаллов льда в живой ткани почти всегда начинается во внеклеточном пространстве с появления центров кристаллизации и только после значительного снижения температуры распространяется на интрацеллюлярное пространство. Для того чтобы превратить в лед внеклеточную жидкость, необходимо снизить температуру среды до -5 -10°C , для замораживания жидкости внутри клеток необходима более низкая температура (-20°C и ниже).

Исчерпывающего объяснения механизма холодовой деструкции живых клеток и ткани не существует. Многочисленные исследования позволили установить некоторые причины, обуславливающие необратимость деструкции клеток при их замораживании. К этим факторам относятся значительная дегидратация клеток, ведущая к резкому повышению концентрации электролитов, механическое повреждение клеточных мембран кристаллами льда, а также сдавливание клеточных тел этими кристаллами, денатурация фосфолипидов в клеточных мембранах, прекращение подвижности внутриклеточной жидкости, развитие очага ишемического некроза в результате остановки кровотока в объеме замороженной ткани. Интенсивность криодеструкции зависит от индивидуальной устойчивости ткани к холоду, ее температуры и скорости охлаждения, экспозиции воздействия, а также скорости и времени оттаивания ткани после него.

Криохирurgia обеспечивает возможность полного разрушения заданного объема ткани. Действие холодом не сопровождается выраженной перифокальной реакцией, окружающие ткани повреждаются минимально, предупреждается развитие кровотечений за счет блокады мелких артериальных и венозных сосудов в зоне крионекроза, что позволяет производить разрезы практически бескровно даже в самых богато васкуляризированных органах. Отсутствие повреждающего действия на стенки крупных сосудов позволяет проводить криодеструкцию в непосредственной близости от них. Очаги криодеструкции быстро заживают без развития грубых рубцовых процессов, что дает хороший косметический эффект.

Криохирургические воздействия проводят с помощью специальных аппаратов, главными составными частями которых являются наконечник направленного и ограниченного по площади действия, резервуар с хладагентом (автономные аппараты) или система подводящих шлангов, подающих хладагент к наконечнику от стационарной емкости. В качестве хладагента наиболее часто используют жидкий азот. Существуют криохирургические аппараты для выполнения различных операций. Для выполнения криохирургических операций обычно применяют аппараты с дистанционно связанными криоаппликаторами, которые обеспечиваются хладагентом из основных источников— баллонов, сосудов Дьюара и др. Имеются также криохирургические аппараты с управляемым режимом замораживания и оттаивания, способные осуществлять криовоздействие по заранее разработанной программе и вносящие коррективы в процесс в зависимости от объективных характеристик охлаждения ткани.

Несмотря на то, что криохирurgia уже используется в дерматологии, нейрохирургии, онкологии, офтальмологии, оториноларингологии, абдоминальной хирургии, урологии, гинекологии, педиатрии и др., требуются дополнительные исследования как механизмов, регулирующих иммунный статус организма, подвергающегося холодовому воздействию. В

этом направлении требуется разработка и использование подходящих животных моделей с различными патологиями, с использованием которых можно, с одной стороны, установить оптимальные режимы использования криотерапии, и, с другой стороны, оценить роль и участие основных звеньев иммунной системы в формировании устойчивого терапевтического эффекта. Ниже будут описаны некоторые предложения по использованию животных моделей, всего 4 разных моделей патологии с использованием лабораторных животных (мышей и крыс).

1. Модель артрита

Ревматоидный артрит – хроническое аутоиммунное системное воспалительное заболевание соединительной ткани с преимущественным поражением суставов по типу эрозивно-деструктивного прогрессирующего полиартрита. Это заболевание по данным Всемирной Организации Здоровья в разных странах диагностируется у 0.5-1% населения.

Криотерапия, как связанная с общим охлаждением организма, так и локальная, с успехом применяется при острой и при хронической формах ревматоидного артрита, способствуя существенному улучшению состояния пациентов [Hirvonen et al., 2006, Braun et al, 2009]. Тем не менее, механизмы формирования реакций организма при лечении артрита криовоздействием практически не изучены.

Можно предположить, что положительный эффект холодового воздействия может быть связан со стрессовой реакцией организма. Местное применение в качестве охлаждающего агента жидкого озонированного кислорода может способствовать попаданию активных форм кислорода в ткани, активации локализованной клеточной стрессовой реакции и продукции защитных факторов, включая белки теплового шока, цитокины, оксид азота и др.

Краткое описание животной модели артрита:

Экспериментальный коллаген-индуцированный артрит (КИА) хорошо охарактеризован, как в плане патогенеза, так и в иммунологическом аспекте.

Аутореактивность к хрящевому коллагену типа II (**Кол II**) у пациентов с ревматоидным артритом, хотя и не является определяющей, тем не менее, является прямым признаком заболевания. Так, гуморальный ответ на **Кол II** обнаруживается у 30-70% пациентов с ревматоидным артритом, в зависимости от стадии заболевания. Множество параллелей между ревматоидным артритом и КИА, в сочетании с относительной легкостью индуцирования последнего, делают его подходящей и воспроизводимой моделью, широко применяемой при исследованиях аутоиммунного артрита.

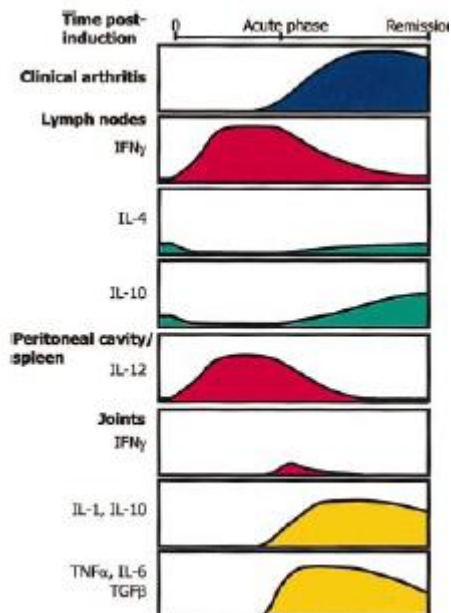
Эта патология может быть вызвана у крыс при использовании одной внутрикожной инъекции коллагена **Кол II**, эмульсифицированного в адьюванте Фрейнда. Аналогичные патологии могут быть вызваны у приматов и чувствительных линий мышей (например, DBA/1J). КИА может быть индуцирован аутологичным или гетерологичным **Кол II**, тогда как иммунизации коллагенами **Кол I** и **Кол III** заболевания не вызывают.

У крыс индукция артрита вызывается как неполным (IFA), так и полным адьювантом Фрейнда (CFA), тогда как у мышей необходимо присутствие в адьюванте ослабленных бактерий *Mycobacterium tuberculosis*. Иммунизация **Кол II** /CFA приводит к суставному полиартриту, первые признаки которого проявляются через 3-4 недели, и ухудшение состояния животных прогрессирует еще в течение 2-4 недель, после чего симптомы медленно исчезают. Индукция аутологичным **Кол II** дает хроническую форму артрита с отсроченным началом и сниженным проникновением, в сравнении с гетерологичным **Кол II**. [Luross & Williams, 2001].

Вариантом этой модели является введение мышам (линии C57/BL 6) коктейля из 4 моноклональных антител СII (Arthrogen-CIA; производитель Chondrex) к бычьему **Кол II**, распознающих консервативные эпитопы молекул коллагенов с последующим введением LPS из *Escherichia Coli* на 3-й день для синхронизации развития артрита [Banda et al., 2009]. Производитель коктейля утверждает, что артрит развивается на 4-й день, а терапевтические эффекты можно выявлять на 7-й день.

Продукция цитокинов системными и ткане-специфичными популяциями клеток имеет большое значение для развития аутоиммунного ответа и патологии при КИА.

На Рисунке показана динамика продукции цитокинов на разных стадиях заболевания у мышей DBA/1 [Luross & Williams, 2001].



Авторы указанной работы считают, что у мышей DBA/1 КИА опосредуется Th1-ответом. Однако выраженный гуморальный компонент и продукция цитокинов, связанных с клетками Th2 в течение заболевания предполагают участие обоих типов Th (CD4+) клеток.

На системном уровне среда, в которой первоначально дифференцируются КолII-специфичные Т-клетки определяется, в основном, иммунным ответом на мико-бактериальный компонент адьюванта, тогда как воспалительный процесс в суставах определяется, в основном, анти- КолII -ответом. Критичная роль в последнем процессе принадлежит провоспалительным цитокинам ФНО-альфа и ИЛ-1.

2. Животная модель острого воспаления верхних дыхательных путей (на примере воспаления трахеи)

Эта модель разработана и используется в Институте биофизики клетки РАН. Была разработана аппаратура и ряд приспособлений для введения тонкого зонда непосредственно в трахею крыс линии Вистар весом 150-200 г.

индуцировано инъекцией зимозана (известного про-воспалительного агента) непосредственно в область гортани, что приведет к довольно быстрому (в течение 2-3-х суток) развитию очага воспаления. Рак гортани вызывается инъекцией раковых клеток, при этом должна быть подобрана подходящая линия опухолевых клеток и определена динамика развития опухолевого процесса. С использованием этих моделей может быть исследована возможность лечения острого воспаления или рака гортани с применением как криоорошения, так и криоаппликации.