

## ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

по теме

### **“Разработка критериев оценки иммунного статуса животных с экспериментальными злокачественными опухолями, подвергнутых лечению с помощью криохирургии”**

Е.Е. Фесенко

Институт биофизики клетки РАН

Метод криохирургии получил широкое распространение при косметических и пластических операциях, но самым важным представляется использование этого приема при хирургическом лечении рака. В обычной хирургической практике, без применения холода, трудно достичь полного иссечения опухоли, в результате чего оставшиеся в организме раковые клетки продолжают активно делиться, поражая метастазами организм. При «замораживании» опухоли с помощью сверхнизких температур раковые клетки погибают и уничтожаются с помощью иммунной системы организма, которая также препятствует их дальнейшему образованию и росту.

Предотвращение метастазирования – это основное условие успешного лечения, именно по этой причине с внедрением в практику криохирургии связывают надежду на большой прорыв в лечении рака. В результате применения данного метода во многих случаях удастся избежать многочисленных сложнейших операций, многодневного пребывания в стационаре и таких видов лечения, как химиотерапия или радиационное облучение. Криохирургические операции проводятся практически без потери крови, без последующего образования шрамов и рубцов, а также при крайне низких болевых симптомах, что позволяет использовать минимальное количество анестезирующих препаратов.

Следует отметить, что в настоящее время ведутся активные технологические разработки по совершенствованию инструментария для криохирургии, уже созданы удобные портативные автономные криохирургические аппараты, работающие без использования жидкого азота. Принцип действия таких криодеструкторов со съемными картриджами основывается на применении сжиженного оксида азота. При попадании на обрабатываемую зону газ мгновенно испаряется, при этом температура испарения газа достигает  $-89\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Криохирургическое лечение имеет пока не очень длинную историю, используется только в некоторых клиниках, поэтому необходима разработка наиболее успешных методик применения этого современного метода лечения, которые можно отработать на животных. В Институте биофизики клетки есть большой опыт работы с животными - опухоленосителями, экспериментальные опухоли у которых могут быть индуцированы применением разных штаммов раковых клеток. Среди этих линий раковых клеток имеются и те, которые вызывают активное метастазирование привитых солидных опухолей. Например, клетки карциномы Льюиса (Lewis Lung Carcinoma - LLC), привитые на заднюю конечность мыши, индуцируют метастазы в легких. Важно отметить, что процесс метастазирования у животных с экспериментальными опухолями можно оценивать количественно с очень большой точностью. Это является хорошим инструментом для оценки последствий проведения криохирургического лечения животных, выполненного при выбранных режимах воздействия криодеструктора (например, время и кратность воздействия).

С использованием больших групп животных можно получать статистически достоверные данные о выживаемости животных, подвергнутых криохирургическому лечению. Кроме того, с использованием животных с экспериментальными опухолями возможно корректно оценивать динамику развития опухоли и процесса метастазирования, а также фиксировать последствия криохирургического лечения, применяемого на разных стадиях опухолевого роста.

В Институте биофизики клетки имеется большой опыт использования различных приемов, включая низкоинтенсивные электромагнитные излучения, для повышения противоопухолевой резистентности животных. Феноменологически это проявляется в стимуляции экспрессии белка теплового шока БТШ70, продукции фактора некроза опухолей, повышении скорости пролиферации основных популяций клеток иммунной системы, в повышении уровня иммунного ответа, стимуляции активности естественных киллерных клеток, увеличении уровня антителообразования. Стимулирующее действие низкоинтенсивного ЭМИ СВЧ в подобранном нами оптимальном режиме было подтверждено на физиологическом уровне по повышению противораковой резистентности животных-опухоленосителей (Fesenko et al., 1999; Novoselova et al., 2005; Новоселова и др., 2004). У авторов имеется патент “Способ профилактики и лечения иммунодефицитных состояний млекопитающих путем воздействия слабых комбинированных электромагнитных полей” № 200217955/14(018999).

Результаты этих исследований, проводимых в течение 10-ти лет, позволили нам установить *строгую корреляцию* между динамикой опухолевого роста и состоянием

иммунного статуса животных с экспериментальными опухолями. Эти сведения могут быть использованы для мониторинга иммунного статуса животных после криохирургического лечения, показатели этого мониторинга будут важны для прогноза последствий оперативного лечения. В этих условиях в качестве основных показателей иммунного статуса организма считаем целесообразным исследовать продукцию цитокинов (фактора некроза опухолей- $\alpha$ , интерферона- $\gamma$  и интерлейкинов (ИЛ-1 $\alpha$ , Ил-1 $\beta$ ), Ил-2, Ил-3, Ил-6, Ил-10), оксида азота (NO) и белков теплового шока.

Особенно важное значение при использовании криохирургии приобретает семейство белков теплового шока. Действительно, применение этого метода приводит к резкому температурному стрессу для клеток здоровой ткани, граничащей с опухолью. После прекращения холодового воздействия происходит быстрое разогревание этой ткани, что должно приводить к пику продукции индуцибельных форм белков теплового шока. Полагаем, что сам факт активации экспрессии стрессовых белков в этих условиях представляет собой нормальную реакцию, направленную на сохранение здоровых клеток. В данном случае важно оценить степень обратимости этой реакции. Действительно, чрезмерно длительный стресс в ответ на резкие скачки температуры неминуемо приведет к активации сигнального каскада NF- $\kappa$ B и к апоптозу клеток здоровых тканей. По этой причине сведения о динамике изменений экспрессии белков теплового шока в клетках неопухолевой ткани являются прогностически важными при криохирургическом лечении.

*В данном контексте можно предположить, что все уже упомянутые преимущества криохирургии в сравнении с традиционной хирургией может быть дополнены еще одним – холодовым воздействием на здоровые ткани, граничащие с опухолью. Так, известно, что стрессовый ответ представляет собой универсальную, эволюционно сохраненную программу клеточной защиты. Эта система функционирует в противовес известной программе клеточной гибели (апоптоз), белки теплового шока часто характеризуют как антиапоптозные. Возможно, что лучший пример того, как стрессовый ответ обеспечивает усиление защитной системы клетки иллюстрируется феноменом «приобретенной термотолерантности». Так, клетки, подвергнутые сублетальному тепловому шоку, и культивируемые далее в нормальных условиях, становятся способными выдерживать вторичное и, что важно, даже летальное воздействие. Приобретенная термотолерантность определяется изменениями, вызываемым первичным воздействием, включая увеличенную экспрессию белков теплового шока. Более того, в настоящее время известно об агентах, которые индуцируют стрессовые белки неспецифически (т.е. вырабатывают резистентность к воздействию другой*

*природы). Например, предварительная обработка клеток термошоком вызывает сопротивляемость не только к летальным тепловым воздействиям, но и к токсическим. На этом уникальном феномене может базироваться поиск безопасных способов индукции синтеза белков теплового шока, как внутреннего резерва, обеспечивающего повышение устойчивости организма к воздействию широкого спектра стрессовых воздействий. В конкретном случае использования криохирургии именно стрессовое температурное воздействие (сначала холодное воздействие, затем быстрое нагревание) может обеспечить резистентность к единичным раковым клеткам, не разрушенным при операции.*

Следует отметить, что, учитывая важность экстраполяции данных, полученных с применением животных моделей, на человека – необходимо предусмотреть возможность исследования показателей иммунного статуса с использованием в качестве объекта не только лимфоидные клетки внутренних органов, но и клетки периферической крови животных-опухоленосителей. В перспективе следует разработать способ определения уровня антител к онкопротеинам, характерным для конкретного типа злокачественной опухоли.

#### **Оценка общих объемов и структуры затрат на проведение исследований**

1. При выполнении работ по широкому мониторингу влияния криохирургии на параметры клеточного и гуморального иммунитета животных-опухоленосителей, с оценкой цитокинового профиля (ФНО- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ , ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-6, ИЛ-10), уровней экспрессии ряда белков теплового шока (БТШ70, БТШ90, БТШ27 в клетках и в субклеточных структурах), продукции оксида азота, оценка степени нормализации активности сигнальных каскадов NF- $\kappa$ B и SAPK/JNK - ориентировочная стоимость работ – **5 млн.** рублей в год, срок выполнения 2-3 года.
2. При выполнении ограниченного исследования с оценкой влияния криохирургии на иммунитет животных с экспериментальными опухолями с определением экспрессии белков теплового шока (БТШ70, БТШ90, БТШ27 в клетках и в субклеточных структурах) и оксида азота (NO) ориентировочная стоимость работ - **2 млн.** рублей в год, срок выполнения 2-3 года.