

ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ КРИОХИРУРГИИ

Артемьев С.С.¹, Раджабова З.А-Г.¹, Нажмудинов Р.А.¹, Котов М.А.¹, Мухина Е.В.¹, Степанова Е.О.¹, Раджабова М.А.²

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, e-mail: semen_artemiev@mail.ru;

²ФГБВОУВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, e-mail: radzam@mail.ru

Представлен обзор литературы о развитии криохирургии в экспериментальной и клинической медицине. Рассмотрены основные механизмы воздействия на клетки и ткани низких температур: прямое холодное воздействие, сосудистое и эндотелиальное повреждение тканей, а также криоиммунологические аспекты криохирургического воздействия. Начало криохирургии датируется XIX веком, когда впервые стали применять методы охлаждения с противоболевой целью. Поскольку понимание механизмов ответа тканей на замораживание увеличилось и появились более безопасные методики замораживания, это позволило расширить показания применения этих техник в различных клинических ситуациях. Тем не менее применение криохирургии ограничено отсутствием глубокого понимания механизмов разрушения тканей. Для того чтобы внедрять криохирургию в клинику, очень важно изучить механизмы повреждения клеток при замораживании и контролировать температурные параметры. В настоящее время методы криохирургии применяются в общей хирургии, дерматологии, косметологии, гинекологии, оториноларингологии и онкологии. Большинство литературных источников в настоящее время посвящены криоконсервации, которая не имеет прямого отношения к криохирургии. В криохирургии на клетки оказывают последовательное воздействие различными тепловыми показателями, что делает эффективность криохирургии непредсказуемой, переменной и менее контролируемой.

Ключевые слова: заморозка, криохирургия, повреждающий механизм.

CRYOSURGERY DEVELOPING

Artemiev S.S.¹, Radzhabova Z.A-G.¹, Nazhmudinov R.A.¹, Kotov M.A.¹, Mukhina E.V.¹, Stepanova E.O.¹, Radzhabova M.A.²

¹N. N. Petrov National Medical Research Oncology Center, St. Petersburg, e-mail: semen_artemiev@mail.ru;

²Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, e-mail: radzam@mail.ru

A review of the literature on the development of cryosurgery in experimental and clinical medicine is presented. The main mechanisms of influence on cells and tissues of low temperatures are considered: direct cold exposure, vascular and endothelial tissue damage, as well as cryoimmunological aspects of cryosurgical exposure. The beginning of cryosurgery dates back to the 19th century, when they first began to use cooling methods with analgesic purpose. As the understanding of the mechanisms of tissue response to freezing has increased and safer freezing techniques have emerged, this has led to increased indications of the use of these techniques in various clinical situations. However, the use of cryosurgery is limited by the lack of a deep understanding of the mechanisms of tissue destruction. In order to introduce cryosurgery into the clinic, it is very important to study the mechanisms of cell damage during freezing and to control temperature parameters. Currently, cryosurgery methods are used in General surgery, dermatology, cosmetology, gynecology, otorhinolaryngology and Oncology. Most of the literature is currently devoted to cryopreservation, which is not directly related to cryosurgery. In cryosurgery, cells are influenced by the consistent action of different thermal parameters, which makes the effectiveness of cryosurgery unpredictable, variable and less controlled.

Keywords: cooling, cryosurgery, freezing, mechanisms of freeze injury.

Исторические аспекты криохирургии

Криохирургия берет начало с XIX века, когда Арнотт [1] впервые описал преимущества локального применения охлаждения для различных целей, например для контроля над болевым синдромом. Он использовал солевой раствор, содержащий измельченный лед, при температуре от -18°C до -24°C для лечения местно-распространенного рака молочной железы и матки.

Арнотт использовал эту технику для уничтожения раковых клеток. Цель, которую он преследовал: излечение при ранних стадиях заболевания либо продление жизни при распространенных формах опухолевого процесса. Современная эпоха криохирургии началась в 1961 году, когда Купер и Ли [2] представили свой криохирургический зонд для лечения паркинсонизма и других заболеваний нервной системы. Зонд состоял из трех длинных концентрических трубок, из которых внутренняя труба служила каналом для подачи жидкого азота к кончику. Пространство между внутренней и средней трубкой обеспечивало путь для выхода газа из кончика зонда, в то время как пространство между средней и внешней трубками служило слоем с вакуумной изоляцией, чтобы предотвратить потерю тепла на кончике зонда.

После разработки криозонда применение криохирургии было признано и внедрено в различных клинических ситуациях, таких как заболевания предстательной железы и рак бронхов [3]. Исследования на животных и в клинике вскоре продемонстрировали множество преимуществ замораживания, одно из них – выработка антител [4].

Основные понятия криобиологии

Криохирургия заключается в разрушении тканей при контролируемом замораживании. Основные преимущества этого метода состоят в том, что он менее инвазивен и менее болезнен по сравнению с хирургической резекцией. Тем не менее применение криохирургии ограничено отсутствием глубокого понимания механизмов разрушения тканей.

Каждая клетка в ткани подвергается различным тепловым воздействиям. Клетки, ближайšie к криохирургическому зонду, испытывают самую низкую температуру и самую высокую скорость охлаждения по сравнению с клетками, расположенными дальше от зонда. Температура уменьшается до тех пор, пока температура тканей не станет равна температуре охлаждающей жидкости.

Далее следует период оттаивания, в течение которого зонд удаляется.

Повреждение клеток при криохирургическом воздействии

Прямое повреждение клеток

Прямое повреждение клеток может происходить двумя механизмами.

Первый механизм – гипотеза «минимального объема». При достаточно низких скоростях охлаждения замерзание происходит во внеклеточном пространстве, и клетки пытаются поддерживать равновесие с внеклеточным раствором осмосом [5].

Когда клетки подвергаются высокой концентрации внеклеточного растворенного вещества во время медленного охлаждения, то они сжимаются. По мере того как концентрация растворенного вещества выходит за пределы клетки для достижения

равновесия, градиент химического потенциала уменьшается путем переноса внеклеточной соли в цитоплазму, что приводит к высокой концентрации внутриклеточного растворенного вещества. Кроме того, внезапное воздействие гипотонического раствора приводит к осмотическому разрыву клеток [6].

Существует несколько оговорок в отношении этой концепции «минимального объема». Одна из проблем заключается в том, что не существует фактического минимального объема, когда могут быть сделаны точные измерения. Во-вторых, было замечено, что такая же степень гемолиза может возникать при разных объемах клеток с использованием различных концентраций глицерина. Таким образом, хотя сжатие и повторное расширение клеток являются значительными травмирующими факторами, уменьшение объема клеток, вероятно, не является основной причиной их повреждения [7].

Второй предполагаемый механизм прямого клеточного повреждения – дестабилизация мембраны во время замораживания и оттаивания [8].

Сообщалось о двух различных формах повреждения в холодных нефиксированных клетках во время лиофилизированного обезвоживания.

Первое явление происходит от 0°C до -5°C, когда клеточная стенка сжимается до минимального объема, причем почти 80% клеточной жидкости выводится из клетки.

Во время оттаивания клетки снова расширяются, но лизируются, прежде чем восстановят исходный объем.

Когда клетки первоначально охлаждали до более низких температур, то есть при -10°C, осмотически удалялось приблизительно 90% клеточной воды. Однако, когда клетки оттаивали после воздействия температуры в этих диапазонах, они осмотически не реагировали и не расширялись.

Исследователи предположили, что мембрана была повреждена во время обезвоживания клетки, что привело к нарушению проникновения воды и растворенных молекул в мембрану во время осмотического повторного расширения.

Внутриклеточное образование льда

Переохлаждение определяется как процесс, посредством которого жидкость поддерживает свое жидкое состояние ниже точки замерзания. Переохлажденная вода в клетке обладает более высоким химическим потенциалом и более высокой движущей силой, чтобы покинуть клетку и замерзнуть снаружи. Поэтому, когда скорость охлаждения медленная, клетка становится обезвоженной. Напротив, если скорость охлаждения достаточно высока, образуется внутриклеточный лед.

Механизм, с помощью которого этот процесс происходит, остается спорным. Теория белка-поры [9] предполагает, что внеклеточный лед распространяется на переохлажденную

цитоплазму через водные поры клеточной мембраны.

Считается, что распространение льда во время оттаивания является причиной повреждения клеток. Эта теория опирается на эксперименты в слюнной железе [10] и монослоях конфлюэнтных клеток [11], которые демонстрируют распространение льда через щелевые соединения с выраженной температурной зависимостью.

Поверхностно-катализируемая теория предполагает, что взаимодействие между внеклеточным льдом и плазматической мембраной, характеризующееся углом контакта между клеточной мембраной и льдом, приводит к образованию внутриклеточного льда. Также установлено, что внутриклеточные частицы могут катализировать внутриклеточное образование льда ниже -30°C (объемное катализируемое зарождение) [12].

Конечной гипотезой является теория разрушения мембран, которая предполагает, что внутриклеточное образование льда происходит в результате разрушения мембраны при критическом осмотическом градиенте давления на мембране во время замораживания [13]. Хотя точному механизму внутриклеточного образования льда лишь предстоит быть разгаданным, большинство криобиологов согласны с тем, что внутриклеточное образование льда является смертельным для клеток. Интересно, однако, отметить, что на сливных монослоях фибробластов китайского хомячка V-79W и клеток почки Майн–Дарби, подверженных медленной скорости охлаждения до -40°C [14], образованный внутриклеточный лед может обеспечивать криопротекторные эффекты от обезвоживания.

Таким образом, роль и значение внутриклеточного образования льда еще предстоит определить.

Механизмы сосудистого повреждения

Корреляция между повреждением сосудов и замораживанием была впервые предложена Конгхеймом [15] в 1877 году, когда он предположил, что некроз ткани, подвергшейся заморозке, был вызван застоем кровотока после оттаивания. Позднее Льюис [16] заметил, что сосудистая сеть в поверхностных слоях дермы человека меняется при воздействии низких температур.

Появляются область стаза и зона гиперемии при -5°C , далее при оттаивании кожа достигает прежней температуры с формирующимся окружающим отеком. Последующие исследования также показали, что изменения в сосудистой сети после замораживания и оттаивания, такие как увеличение отека ткани, застой крови и прогрессирующий тромбоз, приводят к некрозу тканей. В совокупности эти результаты подтверждают гипотезу о том, что сосудистые изменения играют важную роль в повреждающем механизме тканей.

Эндотелиальное повреждение при сосудистых изменениях

Были проведены исследования для изучения роли эндотелия при криохирургических

вмешательствах.

Марцелла и др. [17] изучали изменения при замораживании раны кроличьих ушей с помощью микроскопии. Они показали, что микроциркуляторная сеть эндотелия разрушается в течение 1 часа воздействия низкими температурами.

Агрегация тромбоцитов наблюдалась сразу же при оттаивании. Интерстициальный отек также наблюдался через несколько минут после оттаивания с экстравазацией эритроцитов к 6-му часу и эндотелиальным отслоением к 24-му часу.

Было предложено несколько механизмов для объяснения повреждения эндотелия после замораживания.

Первая теория – прямое повреждение клеток, как обсуждалось выше.

Вторая теория касается производства свободных радикалов. При изучении роли свободных радикалов после замораживания и оттаивания [18] выяснилось, что введение супероксиддисмутазы и дефероксамина улучшало жизнеспособность ушей кроликов после обморожения. Электронная микроскопия показала наличие эндотелиального повреждения, сосудистого застоя, адгезии нейтрофилов и агрегации эритроцитов. Было предложено несколько механизмов для объяснения образования свободных радикалов при ишемии и оттаивании.

Первый механизм постулирует, что электронная транспортная цепь внутренней митохондриальной мембраны может быть уменьшена во время ишемии, что приводит к образованию кислородного радикала [19].

Второй возможный источник свободных радикалов – это перекисное окисление липидов. Во время ишемии происходит увеличение свободных жирных кислот и арахидоновой кислоты. При оттаивании возвращается кровоток, а накопленная арахидоновая кислота метаболизируется через липоксигеназу и циклооксигеназу, что приводит к увеличению образования тромбоксанов и супероксидов [20].

Другим предложенным механизмом является образование кислородных радикалов метаболизмом гипоксантина через путь ксантиноксидазы во время оттаивания [21]. Эндотелиальные клетки являются основным источником ксантиноксидазы в кровеносных сосудах, что подразумевает важность взаимодействия эндотелиальных клеток со свободными радикалами во время замораживания и оттаивания.

Теория свободных радикалов спорная, потому что есть сообщения, которые не поддерживают этот вывод [22]. Другим механизмом повреждения после оттаивания является активация нейтрофилов. Предполагается, что лейкоциты могут быть захвачены в микроциркуляторное русло, что приводит к обструкции. Лейкоциты могут также взаимодействовать с тромбоцитами и генерировать свободные радикалы [23]. Ферменты,

высвобождаемые нейтрофилами, повреждают эндотелиальные клетки и увеличивают проницаемость слоя эндотелиальных клеток путем продуцирования активных видов кислорода [22].

Газзанига и др. [24] изучали воспалительные изменения после криохирургии, используя меланому человека, трансплантированную голым мышам.

Они обнаружили, что активация эндотелиальных клеток является первым заметным событием, за которым следует инфильтрация полиморфноядерных клеток, а затем макрофагов. В отличие от этого, используя модель прижизненного применения криотехнологий мышц крыс для изучения изменений микроциркуляции [25], другие исследователи не обнаружили существенной роли адгезии нейтрофилов в раннем ответе.

Аналогичным образом другие исследователи, занимавшиеся криохирургией в гепатологии, сообщили, что были достигнуты схожие разрушения тканей, если бы сосудистая сеть была просто перекрыта [26].

Механизмы иммунологического повреждения

Было предложено несколько механизмов иммунологического повреждения. Первая теория – производство противоопухолевых антител. Когда опухолевые клетки погибают, антигены внутри клеток высвобождаются на мембрану и фагоцитируются антиген-представляющими клетками. Клетки с антителами, специфичными для антигена, стимулируются и трансформируются в плазматические клетки. Образование антител индуцирует фиксацию комплемента, что приводит к нейтрофильному и макрофаговому хемотаксису. Эти клетки высвобождают свободные радикалы и ферменты, которые убивают опухолевые клетки. Эта связь между производством антител при воздействии криохирургическими методиками по-прежнему вызывает споры. Риера и др. [27] обнаружили, что уровень антител снижается у изоиммунизированных кроликов после криохирургии.

Второй механизм иммунологического реагирования заключается в индукции цитотоксических Т-клеток. Обычно внутриклеточные антигены переносят в клеточную мембрану и распознают цитотоксические Т-клетки, которые высвобождают ферменты и убивают клетки.

Было предположено, что криохирургия может влиять на цитотоксические Т-лимфоциты и на представление антигена.

В исследовании, проведенном Эскандари и др. [28], активация Т-клеток достигала максимума через две недели после криохирургического воздействия в опухоли R3327 у копенгагенской крысы и оставалась повышенной по сравнению с контрольной группой.

Третий возможный механизм заключается в том, что криохирургия может

стимулировать активность NK-клеток. Однако взаимосвязь криохирургии и активности NK-клеток до сих пор не определена. Тем не менее реакция иммунной системы на криохирургию, по-видимому, зависит от типа клеток, на которые воздействуют криохирургическим способом.

Например, положительный ответ был продемонстрирован в аденокарциноме простаты R3327, но никакого эффекта не наблюдалось в аденокарциноме молочной железы MRMT-1 [29].

Также, возможно, количество представленных антигенов играет важную роль в стимуляции иммунной системы.

Если количество представленных антигенов больше, чем может выдержать иммунная система, может наблюдаться подавление опухолевого иммунитета. А. Рой и др. [30] обнаружили, что время дожития уменьшилось, если большее количество опухоли, подверженной криодеструкции, было введено животному.

Выводы

Криохирургия развивалась в течение длительного периода времени и продолжает медленно прогрессировать. Однако отсутствие глубокого понимания и знания механизмов клеточного повреждения при воздействии низкими температурами может значительно ограничивать скорость развития и внедрения криохирургии в клиническую практику. Механизмы криохирургии сложны. Дискуссия о том, что клеточная мембрана или внеклеточный лед провоцируют внутриклеточное образование льда, до сих пор не решена, так же как и роль иммунологии в криохирургии.

Большинство литературных источников в настоящее время посвящены криоконсервации, которая не имеет прямого отношения к криохирургии. В криохирургии на клетки оказывают последовательное воздействие различными тепловыми показателями, что делает эффективность криохирургии непредсказуемой, переменной и менее контролируемой.

Предположительно, при лучшем понимании механизмов повреждения клеток при криохирургических вмешательствах данные методики будут иметь больший клинический эффект и приобретут более широкое использование.

Новой областью для исследования является недавняя разработка криопластики при лечении заболеваний периферических сосудов.

Список литературы

1. Arnott J. Practical illustrations of the remedial efficacy of a very low or anesthetic temperature. In cancer. Lancet. 1850. V.2. P.257–259.

2. Cooper I.S., Lee A.S. Cryostatic congelation: A system for producing a limited, controlled region of cooling or freezing of biologic tissues. *J. Nerv. Ment. Dis.* 1961. V.133. P. 259–263.
3. Grana L., Kidd J., Swenson O. Cryogenic techniques within the tracheobronchial tree. *J. Cryosurg.* 1969. № 2. P.62–67.
4. Yantorno C., Soanes W.A., Gonder M.J., Shulman S. Studies in cryoimmunology. I. The production of antibodies to urogenital tissue in consequence of freezing treatment. *Immunology.* 1967. V.12. P.395–410.
5. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J. Gen. Physiol.* 1963. V.47. P.347–369.
6. Meryman HT. Modified model for the mechanism of freezing injury in erythrocytes. *Nature.* 1968. V. 218. P. 333–336.
7. Pegg D.E., Diaper M.P. On the mechanism of injury to slowly frozen erythrocytes. *Biophys J.* 1988. V. 54. P. 471–488.
8. Steponkus P.L., Lynch D.V. Freeze/thaw induced destabilization of the plasma membrane and the effects of cold acclimation. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1989. V. 21. P. 21–41.
9. Mazur P. The role of cell membranes in the freezing of yeast and other single cells. *Ann NY Acad. Sci.* 1965. V. 125. P. 658–676.
10. Berger W.K., Uhrík B. Freeze-induced shrinkage of individual cells and cell-to-cell propagation of intracellular ice in cell chains from salivary gland. *Experientia.* 1996. V. 52. P. 843–850.
11. Acker J.P, Elliott J.A., McGann L.E. Intercellular ice propagation: Experimental evidence for ice growth through membrane pores. *Biophys. J.* 2001. V. 81. P. 1389–1397.
12. Toner M., Cravalho E.G., Karel M. Cellular response of mouse oocytes to freezing stress: Prediction of intracellular ice formation. *J. Biomech. Eng.* 1993. V. 115. P. 169–174.
13. Muldrew K., McGann LE. Mechanisms of intracellular ice formation. *Biophys. J.* 1990. V. 57. P.525–532.
14. Acker J.P., McGann L.E. Protective effect of intracellular ice during freezing? *Cryobiology.* 2003. V. 46. P. 197–202.
15. Cohnheim J. Lectures on general pathology: A handbook for practitioners and students. London: The New Sydenham Society, 1889. 528 p.
16. Lewis T., Love W.S. Vascular reactions of the skin to injury. Part III. Some effects of freezing, of cooling, and of warming. *Heart.* 1926. V. 13. P. 27–60.
17. Marzella L., Jesudass R.R., Manson P.N., Myers R.A., Bulkley G.B. Morphologic characterization of acute injury to vascular endothelium of skin after frostbite. *Plast Reconstr. Surg.* 1989. V. 83. P. 67–76.

18. Manson P.N., Jesudass R., Marzella L., Bulkley G.B., Im M.J., Narayan K.K. Evidence for an early free radical-mediated reperfusion injury in frostbite. *Free Radic. Biol. Med.* 1991. V. 10. P. 7–11.
19. Cino M., Del Maestro R.F. Generation of hydrogen peroxide by brain mitochondria: The effect of reoxygenation following postdecapitative ischemia. *Arch. Biochem. Biophys.* 1989. V. 269. P. 623–638.
20. Hamberg M., Svensson J., Samuelsson B. Thromboxanes: A new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1975. V. 72. P. 2994–2998.
21. Granger D.N., Rutili G., McCord J.M. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology.* 1981. V. 81. P. 22–29.
22. Serhan C.N., Broekman M.J., Korchak H.M., Marcus A.J., Weissmann G. Endogenous phospholipid metabolism in stimulated neutrophils differential activation by FMLP and PMA. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 1982. V. 107. P. 951–958.
23. Weiss S.J. Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 1986. V. 548. P. 9–37.
24. Gazzaniga S., Bravo A., Goldszmid S.R., et al. Inflammatory changes after cryosurgery-induced necrosis in human melanoma xenografted in nude mice. *J. Invest. Dermatol.* 2001. V. 116. P. 664–671.
25. Zook N., Hussmann J., Brown R., et al. Microcirculatory studies of frostbite injury. *Ann. Plast. Surg.* 1998. V. 40. P. 246–253.
26. Dilley A.V., Dy D.Y., Warlters A., et al. Laboratory and animal model evaluation of the Cryotech LCS 2000 in hepatic cryotherapy. *Cryobiology.* 1993. V. 30 P. 74–85.
27. Riera C.M., Brandt E.J., Shulman S. Studies in cryo-immunology. IV. Antibody development in rabbits after iso-immunization followed by freezing. *Immunology.* 1968. V. 15. P. 779–787.
28. Eskandari H., Ablin R.J., Bhatti R.A. Immunologic responsiveness & tumour growth of the Dunning R3327 rat prostatic adenocarcinoma following cryosurgery & orchiectomy. *Indian J. Exp. Biol.* 1982. V. 20. P. 872–874.
29. Matsumura K., Sakata K., Saji S., Misao A., Kunieda T. Antitumor immunologic reactivity in the relatively early period after cryosurgery: Experimental studies in the rat. *Cryobiology.* 1982. V. 19. P. 263–272.
30. Roy A., Lahiri S., Lahiri P., Pal S., Ghosh S., Roy B. Immunologic and survival studies in mice immunised with cryodestroyed ascites fibrosarcoma [AFS] cells. *Indian J. Exp. Biol.* 1990. V. 28. P. 1026-1030.