DOI: https://doi.org/10.32345/2664-4738.3-4.2018.03
УДК 616-72:536.483:53.087.44

ДИНАМІКА ЗАМОРОЖУВАННЯ 10 % РОЗЧИНУ КАЛЬЦІЮ ХЛОРИДУ РІДКИМ АЗОТОМ *IN VITRO*

[1]***Дронов О.І.*** *(orcid.org/0000-0003-4033-3195),*
[1]***Ковальська І.О.*** *(orcid.org/0000-0002-6264-2928),*
[1]***Козачук Є.С.*** *(orcid.org/0000-0002-2453-2496),*
[2]***Лук'янова Н.Ю.,***
[1]***Хоменко Д.І.*** *(orcid.org/0000-0002-3911-1088),*
[1]***Бакунець П.П.*** *(orcid.org/0000-0003-2792-0993)*

[1]Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ, Україна
[2]Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України, Київ, Україна
lizakozachuk@gmail.com

Рецензент: проф. Верещако Р.І.

Актуальність. Кріохірургічний метод – метод локального впливу наднизьких температур, з метою повної деструкції патологічного вогнища. На сьогодні, питання радикальності кріохірургічного методу залишається відкритим, в зв'язку з неможливістю досягти летальних для пухлинних клітин температур в найбільш віддалених від кріоаплікатора ділянках вогнища. У зв'язку з чим тривають спроби удосконалення кріохірургічної деструкції, шляхом розробки методик потенціювання цитодеструктивного ефекту наднизьких температур, зокрема, їх поєднання з хімічними агентами.

Метою дослідження було встановити особливості змін температурних показників при заморожуванні 10 % розчину $CaCl_2$ в порівнянні з 0,9 % розчином натрію хлориду *in vitro*.

Матеріали та методи. Зміни низькотемпературних показників в розчинах 10 % $CaCl_2$ та 0,9 % NaCl вимірювали на контрольних глибинах 3, 8, 13 та 18 мм за допомогою комплексу вимірювального термопарного чотириканального «КВІТ-4». Кріогенний вплив виконували кріоінструментом оригінальної конструкції. Кріоагент – рідкий азот (температура -180^{0}С). Фіксацію температурних показників здійснювали впродовж 10-хвилинної експозиції рідкого азоту.

Результати. Під час кріогенного впливу впродовж 10 хвилин на відстані 13 та 18 мм від кріоаплікатора середні температури в розчині 10 % $CaCl_2$ були достовірно нижчими, ніж 0,9 % NaCl ($p<0,05$). На контрольних глибинах, починаючи з п'ятої і до десятої хвилини експозиції, в розчині 10 % $CaCl_2$ температури були достовірно нижчими в порівнянні з 0,9 % NaCl ($p<0,001$).

Висновок. 10 % $CaCl_2$ може потенціювати процеси заморожування *in vitro* і може використовуватись для подальшої розробки способів підвищення ефективності кріодеструкції *in vivo*.

Ключові слова: кріодеструкція, локальний кріовплив, посилення кріодеструкції, 10 % розчин кальцію хлориду.

Актуальність. Кріохірургічний метод – метод, що характеризується локальним застосуванням наднизьких температур, з метою повної деструкції патологічного вогнища. Даний метод активно використовується в онкологічній та хірургічній практиці впродовж багатьох років. Ефективність локальної кріогенної деструкції патологічно змінених тканин залежить не лише від швидкості заморожування і танення, часу експозиції, особливостей місцевого кровопостачання та резистентності тканин до дії низьких температур, а й від можливості досягнення летальних для клітин температур у всьому об'ємі вогнища [5, 6].

Відомо, що в процесі локального заморожування біологічних тканин відбувається формування трьох зон пошкодження: 1) зона глибокого заморожування – розповсюджується на 15-40 мм вглиб від аплікатора (t^{00}= -180^{0}С); 2) перехідна зона – зона часткового пошкодження клітин (10-20мм, t^0 не менше -50^{0}С), майже 50 % клітин можуть виживати; 3) пограничная зона – зона дегідратації клітин (не більше 10 мм, t^0 від 0^{0}С до -20^{0}С), більшість пухлинних клітин можуть залишатись неушкодженими [1].

Враховуючи те, що в пограничній зоні кріогенного впливу низькотемпературні показники не завжди призводять до тотальної цитодеструкції, питання радикальності кріохірургічного методу залишається відкритим. У зв'язку з чим тривають спроби удосконалення кріохірургічного методу шляхом розробки методик потенціювання цитодест-

руктивного ефекту наднизьких температур: повторення кріоциклів, введення в зону майбутнього кріовпливу розчинів лідокаїну, адреналіну, дистильованої води, створення попередньої ішемізації зони інтересу, застосування ультразвуку [2, 3, 4]. На наш погляд, найбільш перспективним напрямком підвищення ефективності кріохірургічного методу є розробка способів, що дозволяють збільшити зону некротичних змін в патологічному субстраті шляхом поєднання дії наднизьких температур та хімічних агентів зі збереженням всіх переваг застосування наднизьких температур.

Мета дослідження – встановити особливості змін температурних показників при заморожуванні 10 % розчину $CaCI_2$ у порівнянні з 0,9 % розчином натрію хлориду *in vitro*.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження виконали на базі Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України.

Визначення особливостей змін низькотемпературних показників в розчинах 10 % $CaCI_2$ та 0,9 % NaCl здійснювали шляхом вимірювання температур на контрольних глибинах 3, 8, 13 та 18 мм за допомогою комплексу вимірювального термопарного чотириканального «КВІТ-4», дослідний екземпляр якого було розроблено кафедрою загальної хірургії №1 спільно з ТОВ НВФ «Пульс» (Київ). Кріогенний вплив виконували за допомогою кріоінструменту оригінальної конструкції, який розроблений в Інституті фізики АН УРСР. Кріоагент – рідкий азот (температура -180^{0}С). Фіксацію температурних показників здійснювали впродовж 10-хвилинної експозиції рідкого азоту.

Статистичну обробку даних виконували за допомогою програмного забезпечення IBM SPSS Statistics Version 23.0. Середні значення показників вказували як M±m, де M – середнє, m – стандартна похибка. Використовували параметричні методи статистичного аналізу. Статистично значимим вважали показники, що відповідали $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Динаміка зниження температур на контрольних глибинах 3, 8, 13 та 18 мм при заморожуванні рідким азотом *in vitro* розчинів 0,9 % NaCl та 10 % $CaCl_2$ впродовж 10 хвилин експозиції наведено на рисунках1-2.

Унаслідок кріогенного впливу формування льодяного шару в розчині 0,9 % NaCl на глибині 3 мм розпочиналось з першої хвилини, 8 мм – з четвертої хвилини, 13 мм – з 6 хвилини, 18 мм – з 9 хвилини. Процес заморожування 10 % $CaCI_2$ на глибині 3мм від поверхні аплікатора розпочинався з 3 хвилини, 8 мм – з 4 хвилини, 13 мм – з 5 хвилини, та 18 мм – з 6 хвилини.

Узагальнення середніх показників температур в розчинах 0,9 % NaCl та 10 % $CaCl_2$ на контрольних глибинах при їх заморожуванні впродовж 10 хвилин наведено в таблиці 1.

Дані, наведені в таблиці 1, свідчать, що достовірної різниці між середніми температурами в досліджуваних розчинах на глибині 3 мм та 8 мм від по-

Рис.1. Динаміка зміни температурних показників заморожування 0,9 % NaCl *in vitro*

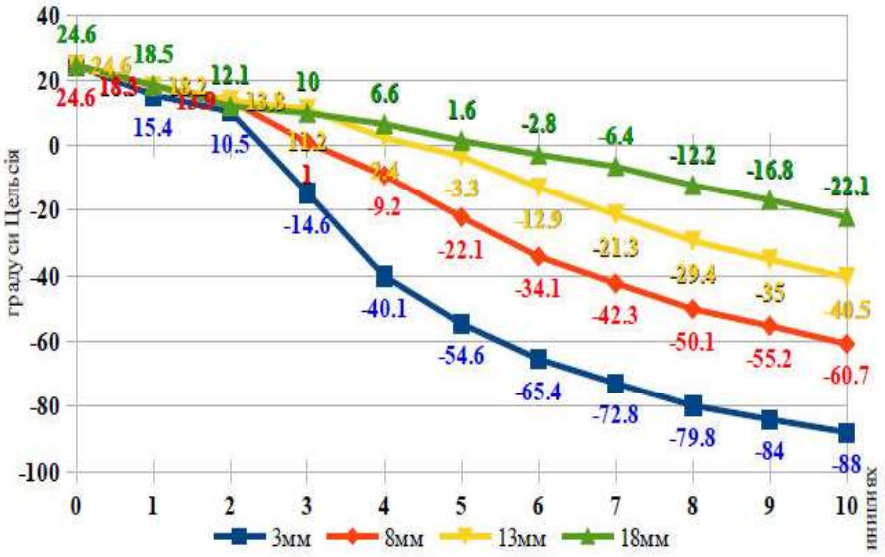

Рис. 2.Динаміка зміни температурних показників заморожування 10 % $CaCl_2$ *in vitro*

Дані, наведені в таблиці 1, свідчать, що достовірної різниці між середніми температурами в досліджуваних розчинах на глибині 3 мм та 8 мм від поверхні кріоаплікатора не виявлено: (-40,5±2,5)^{0}C і (-15,3±1,95) ^{0}C для 0,9 % NaCl (p=0,81) та (-41,6±3,49) ^{0}C і (-19,6±2,56) ^{0}C для 10 % $CaCl_2$ (p=0,19), відповідно. Однак, на відстані 13 та 18 мм від кріоаплікатора середні температурні показники в розчині 10 % $CaCl_2$ були статистично нижчими в порівнянні з 0,9 % NaCl (p=0,01 та p<0,001): (-0,7±1,33) ^{0}C і (9,05±0,82) ^{0}C для 0,9 % NaCl і (-6,6±1,85) ^{0}C і (1,3±1,18) ^{0}C для 10 % $CaCl_2$, відповідно.

В таблиці 2 наведено середні значення температур у розчинах 0,9 % NaCl та 10 % $CaCl_2$ на контрольних глибинах в залежності від часу.

При аналізі динаміки температур до п'ятої хвилини експозиції на глибині 3мм середні температури в 0,9 % NaCl (-17,19±2,33^{0}C) були статистично значимо нижчими, порівняно з 10 % $CaCl_2$ (-8,87±3,31^{0}C) (p=0,042), однак на 8 та 13 мм в досліджуваних розчинах достовірної різниці між ними не виявлено (p=0,557 і p=0,524, відповідно). На відстані 18 мм середні температури в обох розчинах були значно вище 0^{0}C, проте в 10 % $CaCl_2$ (12,28±0,85^{0}C) на 4,2^0 C була достовірно нижчою, ніж в 0,9 % NaCl (16,43±0,51^{0}C) (p<0,001). Починаючи з п'ятої до десятої хвилини, в розчині 10 % $CaCl_2$ на всіх контрольних глибинах середні температури були статистично значимо нижчими в порівнянні з такими в 0,9 % NaCl (p<0,001). Зокрема, середня температура в розчині 10 % $CaCl_2$ (-74,44±1,28 ^{0}C) на відстані 3 мм від кріоаплікатора була на 10,8 ^{0}C нижчою, ніж в 0,9 % NaCl (-63,97±1,02 ^{0}C), 8 мм – на 9,9 ^{0}C (-44,43±1,43 ^{0}C і -34,56±1,10 ^{0}C відповідно, p<0,001), 13 мм – на 10,9 ^{0}C (-24,31±1,41 ^{0}C і -13,40±1,01 ^{0}C відповідно, p<0,001) і на відстані 18 мм – на 11,4 ^{0}C (-9,73±0,88 ^{0}C і 1,70±0,78 ^{0}C відповідно, p<0,001) (див.табл. 2, рис. 3-4).

Таблиця 1

Середні показники температур в розчинах 0,9 % NaCl та 10 % $CaCl_2$ на контрольних глибинах при заморожуванні *in vitro* впродовж 10 хвилин

Глибина	Температура (^{0}C)		P	95% Довірчі межі	
	0,9 % NaCl	10 % $CaCl_2$		нижня	верхня
3мм	-40,5±2,5	-41,6±3,49	0,81	-7,42	9,49
8мм	-15,3±1,95	-19,6±2,56	0,19	-2,07	10,61
13мм	-0,7±1,33	-6,6±1,85	0,01	1,41	10,37
18мм	9,05±0,82	1,3±1,18	0,000	4,94	10,61

Таблиця 2

Середні значення температур в розчинах 0,9 % NaCl та 10 % $CaCl_2$ на контрольних глибинах та їх статистичні відмінності в залежності від часу експозиції *in vitro*

Глибина	Час, хв	Температура (^{0}C)		P	95% Довірчі межі	
		0,9 % NaCl	10 % $CaCl_2$		нижня	верхня
3мм	0-5	-17,19±2,33	-8,87±3,31	0,042	-16,34	-0,31
	5-10	-63,97±1,02	-74,44±1,28	0,000	7,22	13,72
8мм	0-5	3,84±1,27	5,16±1,84	0,557	-5,75	3,12
	5-10	-34,56±1,10	-44,43±1,43	0,000	6,29	13,44
13мм	0-5	11,97±0,78	11,12±1,06	0,524	-1,77	3,45
	5-10	-13,40±1,01	-24,31±1,41	0,000	7,47	14,34
18мм	0-5	16,43±0,51	12,28±0,85	0,000	2,19	6,11
	5-10	1,70±0,78	-9,73±0,88	0,000	9,09	13,76

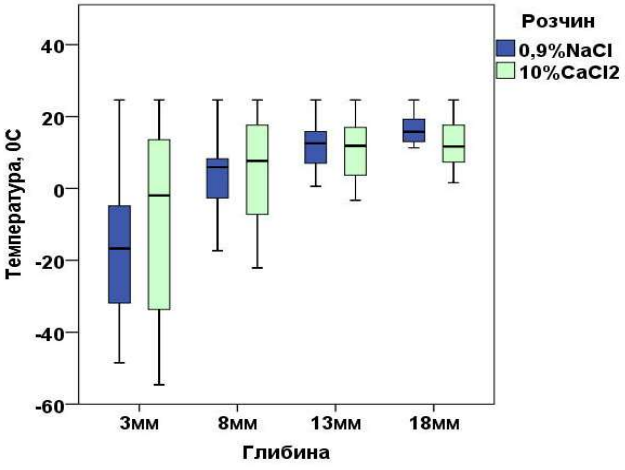

Рис 3. Медіани та міжквартильний розмах значень температурних показників в досліджуваних розчинах на контрольних глибинах в перші 5 хвилин експозиції

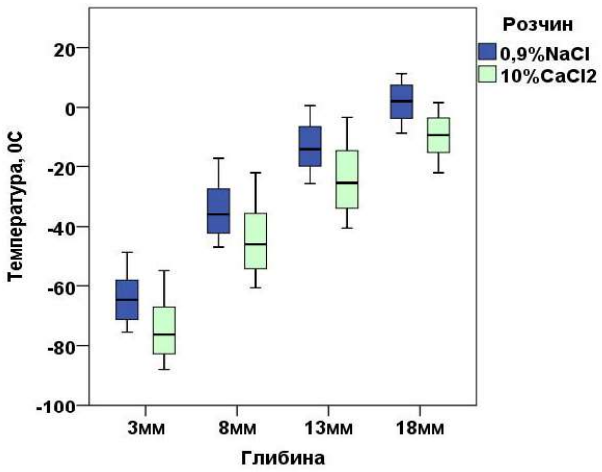

Рис 4. Медіани та міжквартильний розмах значень температурних показників в досліджуваних розчинах на контрольних глибинах з 5 по 10 хвилину експозиції

Аналіз результатів вивчення особливостей динаміки низькотемпературних показників на дискретних відстанях від кріоаплікатора показав, що в розчині 10 % $CaCl_2$ процеси заморожування перебігають більш ефективно, порівняно з 0,9 % NaCl, що визначає доцільність для подальшого його застосування в експериментальних дослідженнях у якості агенту, що може потенціювати кріогенний вплив на біологічні тканини.

ВИСНОВОК

Отримані результати свідчать, що 10 % розчин кальцію хлориду може потенціювати процеси заморожування *in vitro*. Тому його доцільно використовувати з метою подальшої розробки способів підвищення ефективності кріодеструкції *in vivo*.

Конфлікт інтересів. Автори даної статті не мають конфлікту інтересів, який може сприйматись таким, що може завдати шкоди неупередженості статті

Джерела фінансування. Дослідження проведено в рамках науково-дослідної роботи «Застосування кріохірургічних технологій в комплексному лікуванні пухлин гепатопанкреатодуоденальної зони", № держреєстрації 116U00490I; 2016-2018 рр., що виконувалась на кафедрі загальної хірургії №1 НМУ імені О.О. Богомольця і фінансувалось МОЗ України.

ЛІТЕРАТУРА

1. Чжао А.В., Ионкин Д.А., Жаворонкова О.И., Шуракова А.Б., Кунгурцев С.В. Комбинация методов локальной деструкции при первичном и метастатическом раке печени // Российский онкологический журнал. 2014. Т. 19, № 4. С. 53-54. Режим доступу: https://cyberleninka.ru/article/n/kombinatsiya-metodov-lokalnoy-destruktsii-pri-pervichnom-i-metastaticheskom-rake-pecheni
2. Дронов О.І., Хоменко Д.І., Бакунець П.П., Тетеріна В.В. Температурні показники після кріовпливу, потенційованого дистильованою водою, на експериментальній моделі печінки свині за умов відсутності спланхнічного кровотоку // Probl Cryobiol Cryomed. 2017. Т. 27, № 4. С. 348-355. https://doi.org/10.15407/cryo27.04.348
3. Дронов А.И. Ковалская И.А., Хоменко Д.И., Жарков А.Я., Лещенко В.М., Крутько О.А. и др. Термометрия процесса локального криовоздействия в биологической ткани на дискретных глубинах: разработка комплекса измерительного интраоперационного термопарного четырехканального (КИИТ-4) // Хирургия. Восточная Европа. 2018. Т. 7, № 1. С. 21-27. Режим доступу: http://surgery.recipe.by/ru/?editions=2018-tom-7-n-1-2&group_id=item_8&article_id=line_0
4. Шафранов В.В. Механизмы разрушения биологических тканей при локальном криовоздействии // Вестник РАЕН. 2012. № 1. С. 68-77. Режим доступу: https://elibrary.ru/item.asp?id=23715960
5. Щит Н.М., Міхановський О.А., Казмірук О.В. Можливості застосування низьких температур в онкології // УРЖ. 2010. Т. 18, № 4. С. 467-474. Т. 178, № 3. С. 243-266. Режим доступу: http://medradiologia.org.ua/assets/files/arch/2010/4/p467_473.pdf
6. Жмакин А.И Физические основи криобиологии // Успехи физических наук. 2008. Т. 178, № 3. С. 23-25. DOI: 10.3367/UFNr.0178.200803b.024 3.

REFERENCES

1. Chzhao A.V., Ionkin D.A., Zhavoronkova O.I., Shurakova A.B., Kungurcev S.V. Kombinacija metodov lokalnoj destrukcii pri pervichnom i metastaticheskom rake pecheni [Combination of local destruction methods in primary and metastatic liver cancer] // Rossijskij onkologicheskij zhurnal. 2014. Vol. 19, No. 4. P. 53-54. Available at: https://cyberleninka.ru/article/n/kombinatsiya-metodov-lokalnoy-destruktsii-pri-pervichnom-i-metastaticheskom-rake-pecheni [In Russian].
2. Dronov O.I., Khomenko D.I., Bakunecj P.P., Teterina V.V. Temperaturni pokaznyky pislja kriovplyvu, potencijovanogho dystyljovanoju vodoju, na eksperymentaljnij modeli pechinky svyni za umov vidsutnosti splankhnichnogho krovotoku [Temperature changes during cryoeffect potentiated with distilled water assessed in porcine liver model without splanchnic blood flow] // Probl Cryobiol Cryomed. 2017. Vol. 27, No. 4. P. 348-355. https://doi.org/10.15407/cryo27.04.348 [in Ukrainian]
3. Dronov, A.I., Kovalskaja, I.A., Homenko, D.I., Zharkov, A.Ja., Leshhenko, V.M., Krutko, O.A. et al. Termometrija processa lokalnogo kriovozdejstvija v biologicheskoj tkani na diskretnyh glubinah: razrabotka kompleksa izmeritelnogo intraoperacionnogo termoparnogo chetyrehkanalnogo (KIIT-4) [Thermometry of the process of local cryoinfluence in biological tissue at discrete depths: development of a complex of measuring intraoperative four-channel thermocouple (KIIT-4)] // Hirurgija. Vostochnaja Yevropa. 2018. Vol. 7, No. 1. P. 21-27. Available at: http://surgery.recipe.by/ru/?editions=2018-tom-7-n-1-2&group_id=item_8&article_id=line_0 [In Russian]
4. Shafranov V.V. Mehanizmy razrushenija biologicheskih tkanej pri lokalnom kriovozdejstvii [The mechanism of destruction of biological tissue at a local cryodestruction] // Vestnik RAEN. 2012. No. 1. P. 68-77. Available at: https://elibrary.ru/item.asp?id=23715960 [In Russian]
5. Shchit N.M., Mihanovskij O.A., Kazmiruk O.V. Mozhlivosti zastosuvannja nizkih temperatur v onkologii [The capabilities of low temperature application in oncology] // Ukrainskij radiologichnij zhurnal. 2010. Vol. 18, No. 1. P. 467-473. Available at: http://medradiologia.org.ua/assets/files/arch/2010/4/p467_473.pdf [In Ukrainian]
6. Zhmakin A.I. Fizicheskie osnovi kriobiologii [Physical aspects of cryobiology] // Uspehi fizicheskih nauk. 2008. Vol. 178, No. 3. P. 23-25. DOI: 10.3367/UFNr.0178.200803b.024 3 [In Russian]

Отримано: 12.11.2018

ДИНАМИКА ЗАМОРОЖИВАНИЯ 10 % РАСТВОРА ХЛОРИДА КАЛЬЦИЯ ЖИДКИМ АЗОТОМ *IN VITRO*

[1]Дронов А.И., [1]Ковальська я И.А., [1]Козачук Е.С., [2]Лукьянова Н.Ю., [1]Хоменко Д.И., [1]Бакунец П.П.

[1]Национальный медицинский университет имени А.А.Богомольца, Киев, Украина
[2]Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии
имени Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина

Актуальность. Криохирургический метод - метод локального воздействия сверхнизких температур, с целью полной деструкции патологического очага. На сегодня, вопрос радикальности криохирургического метода остается открытым, в связи с невозможностью достичь летальных для опухолевых клеток температур в наиболее удаленных от криоаппликатора участках очага. В связи с чем продолжаются попытки усовершенствования криодеструкции, путем разработки методик потенцирования цитодеструктивного эффекта сверхнизких температур, в частности, их сочетанием с химическими агентами.

Целью исследования было установить особенности изменений температурных показателей при замораживании 10 % раствора $CaCl_2$ по сравнению с 0,9 % NaCl *in vitro*.

Материалы и методы. Изменения низкотемпературных показателей в растворах 10% $CaCl_2$ и 0,9% NaCl измеряли на контрольных глубинах 3, 8, 13 и 18 мм с помощью комплекса измерительного термопарного четырехканального «КИИТ-4». Для заморозки использовали криоинструмент оригинальной конструкции. Криоагент - жидкий азот (температура -180^{0}С). Фиксацию температурных показателей осуществляли в течение 10-минутной экспозиции жидкого азота.

Результаты. Во время криогенного воздействия в течение 10 минут на глубине 13 и 18мм от криоаппликатора средние температуры в $CaCl_2$ были достоверно ниже, чем 0,9% NaCl ($p < 0,05$). На контрольных глубинах, начиная с 5 и до 10 минуты экспозиции, в $CaCl_2$ температуры были достоверно ниже по сравнению с 0,9 % NaCl ($p < 0,001$).

Вывод. $CaCl_2$ может потенциировать процессы замораживания in vitro и может использоваться для дальнейшей разработки способов повышения эффективности криодеструкции in vivo.

Ключевые слова: криодеструкция, локальное криовоздействие, потенциирование криодеструкции, 10% раствор кальция хлорида.

FREEZING DYNAMICS 10% CALCIUM CHLORIDE SOLUTION WITH LIQUID NITROGEN *IN VITRO*

[1]Dronov O.I., [1]Kovalska I.O., [1]Kozachuk Ye.S., [2]Lukyanova N.Yu., [1]Khomenko D.I., [1]Bakunets P.P.

[1]Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine
[2]Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine
lizakozachuk@gmail.com

Relevance. Cryosurgical method is method of ultra-low temperatures local application for complete destruction of the pathological focus.

Nowadays, question of cryosurgery radicality remains unsolve, because of inability to achieve lethal for tumor cells temperatures in depth from cryoapplicator.That's why, attempts of cryodestruction improving are still keep going by developing methods of ultra-low temperatures cytodestructive effect potentiation, particulary, by their combination with chemical agents.

Objective of the study was to determine the peculiarities of changes in temperature indices 10 % $CaCl_2$ solution freezing in comparison with 0,9 % sodium chloride solution (0,9 % NaCl) *in vitro*.

Materials and methods. Dynamic of low-temperatures changes were measured at control depths of 3, 8, 13, and 18 mm in 10% $CaCl_2$ and 0.9% NaCl solutions by a four-channel measuring thermocouple complex KIIT-4. Cryo-tool of the original design was used for freezing. Cryoagent - liquid nitrogen (temperature -180^{0}C). The temperature indices were detected during 10-minute exposure to liquid nitrogen.

Results. During cryogenic exposure for 10 minutes at a distance of 13 and 18 mm from the cryoprobe, the mean temperatures in 10 % $CaCl_2$ were significantly lower than 0,9 % NaCl ($p < 0,05$). At control depths from 5th and 10th minute of exposure in 10 % $CaCl_2$ the temperatures were significantly lower than 0,9 % NaCl ($p < 0,001$).

Conclusion. Consequently, 10 % $CaCl_2$ can potentiate in vitro freezing processes and can be used to further improvemnt cryosurgery efficiency in vivo.

Key words: cryodestruction, local cryoeffect, enhancement of cryodestruction, 10 % solution of calcium chloride