

Влияние предлучевого криовоздействия на рост аденокарциномы Герена в процессе облучения

Н.Е.Узленкова, А.А.Михановский

Институт медицинской радиологии им. С.П.Григорьева АМН Украины, г. Харьков

Influence of Pre-x-ray Cryoeffect on the Growth of Guerin's Adenocarcinoma in the Process of Irradiation

UZLENKOVA N.E., MIKHANOVSKY A.A.

Institute for Medical Radiology of the Academy of Medical Sciences of the Ukraine named by S.P. Grigoriev, Kharkov

Изучали скорость роста аденокарциномы Герена в процессе рентгенотерапии в зависимости от сроков проведения предлучевой криодеструкции опухоли. Результаты исследования показали, что скорость роста опухоли в процессе облучения зависит от сроков проведения криодеструкции. Криовоздействие за 24 ч до начала рентгенотерапии уменьшает скорость роста аденокарциномы Герена в процессе всего облучения. Криодеструкция за 48 ч до начала облучения вызывает лишь кратковременную задержку роста опухоли в первые 2-е суток после начала облучения с последующим его ускорением.

Вивчали швидкість зростання аденокарциноми Герена в процесі рентгенотерапії в залежності від термінів проведення передпроменевої криодеструкції пухлини. Результати дослідження показали, що швидкість зростання пухлини в процесі опромінення залежить від термінів виконання криодеструкції. Криовплив за 24 год до початку рентгенотерапії зменшує швидкість зростання аденокарциноми Герена в процесі всього опромінення. Криодеструкція за 48 год до початку опромінення викликає лише короточасну затримку зростання пухлини в перші дві доби після початку опромінення з наступним її прискоренням.

The authors have studied the growth rates of Guerin's adenocarcinoma in the process of X-ray therapy depending on the performance terms of pre-x-ray tumour cryodestruction. The investigation results have demonstrated that the growth rate for the tumour in the irradiation process depends on the terms of cryodestruction performance. The cryoeffect 24 hrs prior to the X-ray therapy reduces the growth rate of Guerin's adenocarcinoma in the process of the whole irradiation. Cryodestruction 48hrs prior to the start of irradiation causes only a short-time delay in the tumour growth in the first 48hrs after starting the irradiation with its following accelerating.

В последние годы отмечается тенденция к более широкому внедрению метода криодеструкции в онкологическую практику и, в частности, в лечение злокачественных опухолей (ЗО) женской половой сферы. Применение предоперационной криодеструкции опухоли для улучшения абластики и антибластики хирургических вмешательств позволило повысить 5-летнюю выживаемость больных раком вульвы, шейки и тела матки [1-5]. Комбинированное применение ионизирующей радиации и криовоздействия повышает эффективность лечения ЗО. Предлучевая криодеструкция рака тела матки существенно улучшает результаты его сочетанного лучевого лечения [6]. Однако многие аспекты использования низких температур в радиоонкологии еще не исследованы. В частности, практически не изучено влияние сроков криодеструкции опухоли на эффективность криолучевого лечения ЗО. Цель данного исследования - изучение зависимости скорости роста аденокарциномы Герена от сроков проведения предлучевой криодеструкции опухоли.

Опыты были проведены на 96 крысах-самцах массой 160-180 г с подкожно перевитой аденокарциномой Герена. Штамм крысиной аденокарциномы Герена был получен из Института экспериментальной патологии, онкологии и

Recently there is the tendency to a wider introduction of the cryodestruction method to oncological practice and, in particular, malignant tumours (MT) of female sexual sphere. Application of pre-operational tumour cryodestruction for the improvement of ablastics and antiblastics of surgical invasions allowed increasing the five-years' survival of patients with cancer of vulva, cervix uteri and uterus body [1-5]. Combined application of ionizing radiation and cryoeffect increases the efficiency of MT treatment. Pre-x-ray cryodestruction of uterus body cancer (UBC) significantly improves the results of its combined ray treatment [6]. However many aspects of the usage of low temperature in radiooncology have not been studied yet. In particular, the effect of tumour cryodestruction terms on the efficiency of cryoray treatment of MT is not practically investigated. The aim of this investigation was to study the dependence of growth rate of Guerin's adenocarcinoma on the terms of performance of pre-ray tumour cryodestruction.

Experiments were performed in 160-180g male rats (n = 96) with subcutaneously re-cultured Guerin's adenocarcinoma. Strain of Guerin's adenocarcinoma in rats was delivered from the Institute for Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of the National Academy of Sciences of the Ukraine named by R.E. Kavetsky. Transplantation of Guerin's carcinoma

радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины. Трансплантацию аденокарциномы Герена осуществляли введением под кожу крыс 0,5 мл 20%-й суспензии опухолевых клеток (ОК).

Криодеструкция аденокарциномы Герена выполнялась закистью азота при температуре -70°C криогенным гинекологическим аппаратом АКГ-01 контактным способом. Криовоздействие осуществлялось непрерывно в течение 10 мин.

Локальное облучение зоны роста опухоли Герена проводили на аппарате РУМ-17 при стандартных технических условиях: напряжение – 150 кВ, сила тока – 15 мА, фильтры – 0,5 мм Cu_1 и 1,0 мм Al , фокусное расстояние – 25 см. Коэффициент распределения дозы в воздухе 0,97. Тело крыс экранировали трехмиллиметровыми свинцовыми пластинами. Разовая очаговая доза на фракцию составляла 5 Гр; суммарная очаговая доза (СОД) – 40 Гр с интервалом 24 ч между фракциями.

В зависимости от вида воздействия экспериментальных животных распределили следующим образом: группа I (интактный контроль) – животные, опухоли которых не подвергались никакому воздействию; группа II (контрольное облучение) – животные, опухоли которых подвергались фракционированному рентгеновскому облучению без предварительного криовоздействия; группа III – животные с криодеструкцией опухоли за 24 ч до начала облучения; группа IV – животные с криодеструкцией опухоли за 48 ч до начала облучения. В каждой группе было 24 животных.

Количественными критериями эффективности воздействия служили показатели изменения темпов роста и величины регрессии опухоли. При проведении морфометрических исследований оценивали изменения среднего объема опухоли V (cm^3) в каждой экспериментальной группе, среднюю удельную скорость роста опухоли ($\text{cm}^3/\text{сут}$) и время удвоения ее объема T_d (сут).

Объем опухоли каждой крысы в динамике эксперимента рассчитывали по формуле

$$V = \frac{D_1 \cdot D_2 \cdot D_3 \cdot \pi}{6},$$

где D_1, D_2, D_3 – ортогональные диаметры опухоли в трех направлениях.

Размеры опухоли измеряли каждые 2–3 сут, начиная с 10-х суток после перевивки, когда опухолевый узел достигал доступного измерения объема. Общее время наблюдения составило 30 сут.

Время удвоения объема опухоли рассчитывали по формуле

$$Td = \frac{t \lg_2}{3 \lg(V_2/V_1)},$$

was accomplished with subcutaneous introduction of 0.5 ml of 20% tumour cell (TC) suspension.

Cryodestruction of Guerin's adenocarcinoma was carried out by nitrous oxide under the temperature of -70°C with cryogenic gynaecological apparatus ACG-01 by a contact way. The cryoeffect was continuously performed during 10 min.

Local irradiation of the zone of Guerin's tumour growth was performed with the RUM-17 apparatus under standard technical conditions: 150 kV voltage, 15 mA current, 0.5 mm Cu_1 and 1.0 mm Al filters, 25 cm focus distance. The coefficient of dose distribution in air is 0.97. Rat's bodies were screened with 3 mm's lead plates. Single focal dose per one fraction made 5 Gy; total focal dose (TFD) did 40 Gy with the interval of 24 hrs between fractions.

Depending on the type of the effect the animals were divided by the following way: the 1st group (intact control) consisted of animals the tumours of which had not been subjected any effect; the 2nd group (control irradiation) comprised the animals the tumours of which were subjected to fractional x-ray irradiation without preliminary cryoeffect; the 3rd group did the animals with a tumour cryodestruction 24 hrs prior to the irradiation beginning; the 4th group consisted of the animals with tumour cryodestruction 48 prior to the irradiation beginning. Each group comprised 24 animals. Quantitative criteria of the efficiency of the effect served as the indices of the change in growth rates and the value of regression of tumours. When carrying-out the morphometric investigations the changes in average tumour volume V (cm^3) were estimated in each experimental group: an average specific tumour growth rate (cm^3/day) and time of its volume doubling T_d (day).

Tumour volume for each rat in dynamics of the experiment was calculated according to the formula

$$V = \frac{D_1 \cdot D_2 \cdot D_3 \cdot \pi}{6},$$

where D_1, D_2, D_3 - orthogonal diameters of the tumour in three directions.

The dimensions of tumour were measured every 2-3 days, starting from the 10th day after re-culturing, when tumour node reached a suitable for measuring volume. The total observation time made 30 days.

The time of tumour volume doubling was calculated by the formula

$$Td = \frac{t \lg_2}{3 \lg(V_2/V_1)},$$

where V_1, V_2 - the tumour volume at the moment of effect and in 24 hrs after previous measuring, correspondingly, t - time period.

For quantitative evaluation of the value of tumour regression we used the index of tumour growth

где V_1, V_2 – объем опухоли в момент воздействия и через сутки после предшествующего замера соответственно; t – период времени.

Для количественной оценки величины регрессии опухоли использовали показатель торможения роста опухоли (ТРО), который определяли по формуле

$$TPO = \frac{V_k - V_{on}}{V_k} \cdot 100 \%,$$

где V_k, V_{on} – средний объем опухолей в контроле и экспериментальной группе соответственно. Для каждого изученного вида терапевтического воздействия рассчитывали индекс торможения или эффективности

$$ИЭ_{on} = \frac{V_k}{V_{on}}$$

и индекс роста опухоли, который служит интегральным критерием, характеризующим совокупный эффект и продолжительность терапевтического воздействия:

$$ИР_{on} = \frac{S_{on}}{S_k},$$

где S_{on}, S_k – площадь под кинетической кривой роста опухоли в экспериментальной и контрольной группе соответственно.

Клетки аденокарциномы Герена, трансплантированные подкожно в область левого бока половозрелым крысам, через две недели макроскопически представляли собой инкапсулированные узловатые опухолевые образования, резко контурирующиеся под шкуркой животного.

Как видно из представленных данных таблицы, после подкожной имплантации аденокарциномы Герена ее размеры увеличиваются достаточно быстро, достигая к 7-м суткам величины, которую можно измерять. Исходные значения объема опухоли перед началом эксперимента составили в среднем $5,14 \pm 0,48 \text{ см}^3$, достоверно не отличаясь во всех исследуемых группах.

В группе I (контроль) объем опухоли закономерно возрастал, достигая к 30-м суткам средних значений $53,16 \pm 2,92 \text{ см}^3$.

Облучение опухоли в терапевтическом режиме (группа II) приводило к торможению ее роста, начиная с СОД 15 Гр. Объем опухоли в группе контрольного облучения в эти сроки был на $20,9 \pm 6,3\%$ ниже по сравнению с интактным контролем и к концу курса облучения (СОД 40 Гр) составил $43,7 \pm 8,1\%$ (рис. 1).

Предлучевая криодеструкция опухоли оказывала влияние на эффект облучения, вызывая изменение ее размеров в более ранние сроки (15-е сутки) после

inhibition (THI), which was found according to the formula

$$THI = \frac{V_k - V_{ex}}{V_k} \cdot 100 \%,$$

where V_k, V_{on} – an average tumour volume in the control and experiments, correspondingly. For each studied type of therapeutic effect we have calculated the index of inhibition or the efficiency (IE)

$$IE = \frac{V_k}{V_{ex}}$$

and index of tumour growth (ITG), which serves as an integral criterion, characterising a total effect and duration of therapeutic effect:

$$ITG = \frac{S_{ex}}{S_c},$$

where S_{ex} and S_c – surfaces under kinetic curve of tumour growth in experimental and control group, correspondingly.

Cells of Guerin's adenocarcinoma, subcutaneously transplanted to the area of left side to mature rats, in two weeks macroscopically represented the encapsulated node-like tumour formations sharply seen under animal's skin.

As the table data show after subcutaneous implantation of Guerin's adenocarcinoma its sizes are increased, by approaching to the 7-th day the value which can be measured. Initial values of the tumour volume before the experiment beginning made in average $5.14 \pm 0.48 \text{ cm}^3$ and did not differ statistically and significantly in all investigated groups.

In the first group the tumour volume appropriately increased, by reaching to the 30th day the average values of $53.6 \pm 2.92 \text{ cm}^3$.

Irradiation of the tumour under therapeutic regimen (group II) resulted in the inhibiting of its growth, starting from 15 Gy TFD. The tumour volume in the group of control irradiation within these terms was by $20.9 \pm 6.3\%$ lower than intact control and to the end of the irradiation course (TFD 40 Gy) made $43.7 \pm 8.1\%$ (Fig. 1).

Pre-x-ray cryodestruction of the tumour affected the irradiation influence, by causing the change in its sizes in earlier terms (the 15th day) after the beginning of ray effect in comparison with the group of control irradiation. It has been established that the character of the tumour growth after following irradiation is affected by the term of cryoeffect performance.

As the figure 2 shows the cryodestruction of Guerin's adenocarcinoma 48 hrs prior to irradiation (group IV) caused a short-term delay with the tumour

Динамика роста аденокарциномы Герена в группах I–IV животных
Dynamics of Guerin's adenocarcinoma growth in the I-IV groups of animals

Серии исследований Investigation series	Число животных Number of animals	Средний объем опухоли, см ³ An average volume of tumour, cm ³				
		Сроки наблюдений (сутки после перевивки) Observation terms (24hrs after re-culturing)				
		10-е 10th	12-е 12th	15-е 15th	21-е 21st	30-е 30th
Контроль Control	20	5,09±0,52	8,77±0,97	17,97±3,80	32,53±3,76	53,92±6,03
Облучение без криодеструкции Irradiation without cryodestruction	20	5,14±0,42	8,60±0,81	14,21±1,14	20,74±2,32*	30,04±4,38*
Облучение с криодеструкцией за 24 ч With cryodestruction for 24 hrs	20	4,59±0,33	7,04±1,16	9,23±1,73*	12,57±1,67*	17,48±2,98*
Облучение с криодеструкцией за 48 ч With cryodestruction for 48 hrs	20	4,45±0,67	5,28±0,58	8,64±1,85*	13,48±3,11*	25,46±2,11*

Примечание: * – достоверное отличие по отношению к контролю.
Notes: * - statistically significant difference in respect of the control.

начала лучевого воздействия по сравнению с группой контрольного облучения. Было установлено, что на характер роста опухоли в условиях последующего облучения влияет срок проведения криовоздействия.

Как видно из рис. 2, криодеструкция аденокарциномы Герена за 48 ч до облучения (группа IV) вызывала кратковременную задержку роста опухоли в первые 2-е суток после начала облучения. В последующем это состояние сменялось ускорением ее роста. К концу курса облучения показатель объема опухоли в этой группе достоверно не отличался от объема облученных опухолей контрольной группы. В группе III такой эффект не наблюдался. Показатель ТРО в этой группе на 30-е сутки составил $41,8 \pm 9,9\%$ по отношению к группе контрольного облучения.

Для количественной оценки эффекта криовоздействия была рассчитана скорость роста опухоли по показателю T_d . Установлено, что контрольные опухоли, начиная с 10-х суток после перевивки, росли со скоростью, которая приводила к удвоению их объема в среднем через каждые $20,6 \pm 3,23$ ч. В дальнейшем скорость роста опухоли замедлялась и к 30-м суткам показатель $T_d = 77,18 \pm 7,27$ ч.

Скорость роста облученных опухолей без криовоздействия в начале эксперимента практически не отличалась от таковой в контроле ($23,18 \pm 5,16$ ч). К концу сроков наблюдения облучение вызывало замедление темпов роста опухоли, в среднем показатель $T_d = 94,15 \pm 17,92$ ч.

Скорость роста опухоли в группах с криодеструкцией зависела от времени проведения криовоздействия. В группе III она закономерно уменьшалась в динамике облучения: показатель T_d в период облучения при СОД 25–35 Гр возрастал до средних значений $70,2 \pm 17,7$ ч (против $58,79 \pm 13,48$

growth during the first 48hrs after the irradiation onset. Later this state was changed by the accelerating of its growth. To the end of the irradiation session the index of tumour volume in this group was not statistically true different from the volume of irradiated tumours of the control group. There was no such an effect in the 3rd group. The index of tumour development inhibition in this group to the 30th day made 41.8 ± 9.9 in respect of the control irradiation group.

For the quantitative estimation of cryoeffect we have calculated the rate of tumour growth on the index T_d . It has been established that the control tumours starting from the 10th day after re-culturing grew with the rate, which resulted in the doubling of their volume in average in every 20.6 ± 3.23 hrs. Afterwards the rate of tumour growth was slowed down and to the 30th day the index T_d made 77.18 ± 7.27 .

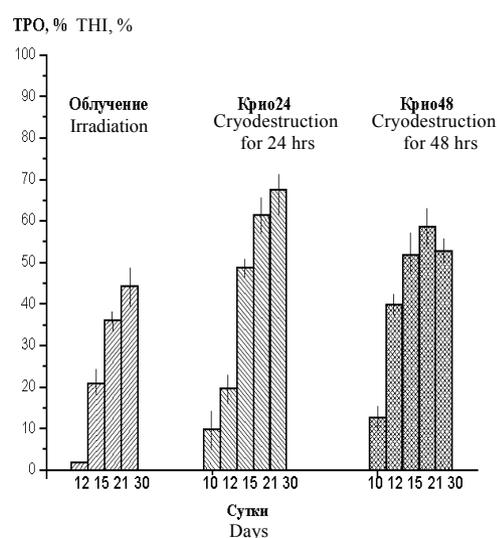


Рис. 1. Процент торможения роста опухоли.
Fig. 1. Percentage of tumour growth inhibition (THI).

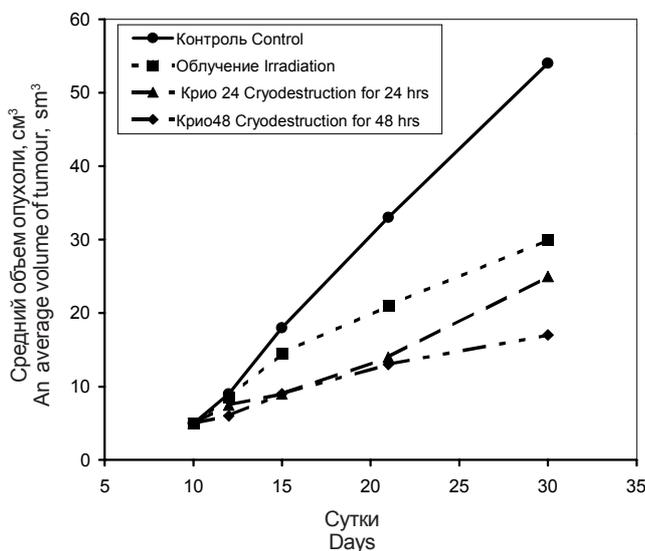


Рис. 2. Изменения параметров опухоли в условиях облучения и криодеструкции.

Fig. 2. Changes in tumour parameters under irradiation and cryodestruction.

в группе контрольного облучения) и к концу курса составлял $114,3 \pm 27,9$ ч.

В группе IV резкое замедление скорости роста опухоли после первых 2-х сеансов облучения ($T_d = 57,2 \pm 9,34$ против $T_d = 23,18 \pm 5,16$ ч при изолированном облучении) сменялось увеличением темпов ее роста по сравнению с группами II и III.

Индекс эффективности терапевтических воздействий, рассчитанный для экспериментальных групп животных, составил: к концу сроков облучения 1,67 – в группе контрольного облучения; 3,08 – в группе с криовоздействием за 24 ч до начала рентгенотерапии; 2,11 – в группе с криовоздействием за 48 ч.

Таким образом, проведенные исследования показали, что предлучевая криодеструкция аденокарциномы Герена усиливает эффект облучения, оказывая значительное ингибирующее воздействие на рост опухоли в эксперименте. При этом эффект криолучевого воздействия зависит от сроков проведения криодеструкции опухоли и СОД. Рентгенотерапия СОД 25–40 Гр с криовоздействием за 24 ч до начала облучения вызывает более выраженное снижение темпов роста опухоли по сравнению с криодеструкцией за 48 ч, при которой отмечается лишь кратковременное снижение скорости роста опухоли в начальный период облучения (СОД 5–15 Гр).

Литература

1. *Водолажская П.П.* Реабилитация больных раком шейки матки после криохирургического лечения // Тез. докл. II съезда онкологов стран СНГ.– Киев, 2000.– С. 997.
2. *Воробьева Л., Турчак А.* Лечение больных микроинвазивным раком вульвы криохирургическим методом // Тез. докл. II съезда онкологов стран СНГ.– Киев, 2000.– С. 998.

The growth rate of irradiated tumours without cryoeffect at the start of the experiment did not practically differ from that in the control 23.18 ± 5.16 hrs. To the end of observation terms the irradiation caused the slowing down of the rates of tumour growth and in average the index T_d was equal to 94.15 ± 17.92 hrs.

The rate of tumour growth in the groups with cryodestruction depended on the time of cryoeffect performance. In the 3rd group it appropriately reduced in irradiation dynamics: the T_d index within the period of irradiation at TFD 25–35 Gy increased up to the average values of 70.2 ± 17.7 (versus 58.79 ± 13.48 in the group of control irradiation) and to the end of the session made 114.3 ± 27.9 .

In the 4th group a sharp slowing-down of the tumour growth rate after the first 2 sessions of irradiation ($T_d = 57.2 \pm 9.34$ versus $T_d = 23.18 \pm 5.16$ hrs under isolated irradiation) was changed with the increase in the rates of its growth in comparison with the 2nd and 3rd groups.

Index of efficiency of therapeutic effects, calculated for the experimental groups of animals, made: to the end of irradiation 1.67 for the group of control irradiation; 3.08 for the group with cryoeffect 24 hrs prior to the start of X-ray therapy; 2.11 in the group with cryoeffect 48 hrs prior to start of X-ray therapy.

Thus the carried out investigations have shown that pre-x-ray cryodestruction of Guerin's adenocarcinoma strengthens the irradiation effect, by causing a significant inhibiting effect on the growth of tumour in the experiment. In this case the effect of cryoray effect depends on the terms of cryodestruction performance and TFD. X-ray therapy with TFD 25–40 Gy with the cryoeffect 24 hrs prior to irradiation causes more manifested reduction of the rates of tumour growth in comparison with the destruction 48 hrs prior to irradiation, during which there is noted only a short-term reduction in the rate of tumour growth during an initial period of irradiation (TFD 5–15 Gy).

References

1. *Vodolazhskaya P.P.* Rehabilitation of the patients with cervix uteri cancer after cryosurgical treatment // Proc. of reports of the II-nd congress of oncologists of NIS countries.– Kiev, 2000.– P. 998.
2. *Vorobyeva L., Turchak A.* Treatment of patients with microinvasive cancer of vulva by cryosurgical method // Proc. of reports of the II-nd congress of oncologists of NIS countries. – Kiev, 2000. – P. 997.
3. *Kokhanovich E.V., Dzyubko N.Ya, Grinevich Yu.A. et al.* Pre-operational cryodestruction in a combined treatment of cervix uteri cancer // *Pediatrics, akusherstvo i ginekologiya.* – 1981.– N 6.– P. 51-55.
4. *Mikhanovsky O.A.* The five-years' results of a combined treatment of endometrium cancer with pre-operational cryodestruction of tumour // *Ukr. Radiologichny zhurnal.* – Kharkov, 1998.– Vol. 6, N 3.– P. 294-297.

3. *Коханевич Е.В., Дзюбка Н.Я., Гриневич Ю.А., и др.* Предоперационная криодеструкция в комбинированном лечении рака шейки матки // Педиатрия, акушерство и гинекология.– 1981.– № 6.– С. 51-55.
4. *Міхановський О.А.* П'ятирічні результати комбінованого лікування раку ендометрія із передопераційною криодеструкцією пухлини // Укр. радіологічний журн.– 1998.– Т.6, №3.– С. 294-297.
5. *Михановский А.А., Радзишевская Е.Б.* Влияние предоперационной криодеструкции опухоли на абластику хирургических вмешательств у больных раком тела матки // Медицина сегодня и завтра.– Харьков, 2001.– С. 114-116.
6. *Міхановський О.А., Сухіна О.М., Єфімова Г.С. та ін.* Перший досвід використання передпроменевої криодеструкції пухлини у поєднано-променевому лікуванні раку тіла матки // Укр. радіологічний журн.– 1999.– Т. 7, № 1.– С. 54-55.
5. *Mikhanovsky A.A., Radzishevskaya E.B.* Effect of pre-operational cryodestruction of tumour on the ablastics of surgical invasions in the patients with uterus body cancer // Medicine today and tomorrow.– Kharkov 2001.– P. 114-116.
6. *Mikhanovsky O.A., Sukhina O.M., Efimova G.S. et al.* The first experience of application of pre-x-ray cryodestruction of tumour in a combined ray treatment of uterus body cancer // Ukr. Radiologichny zhurnal.– 1999.– Vol. 7, N 1.– P. 54-55.

Accepted in 02.07.2002

Поступила 02.07.2002