

ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ НАУКА – ПРАКТИЧЕСКОМУ ЗДРАВООХРАНЕНИЮ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616-006.04-089:616.137.83-005.7-021.6-092.9

Якунина М.Н.¹, Фадеев А.С.², Калишьян М.С.², Трещалина Е.М.¹, Долгушин М.Б.¹

ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ ЭМБОЛИЗАЦИИ КРУПНЫМИ МИКРОСФЕРАМИ БЕДРЕННОЙ АРТЕРИИ КРЫС И КРОЛИКОВ

¹ФГБНУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина», 115478, г. Москва; ²Советская участковая ветеринарная лечебница, 115201, г. Москва

Изучение крупных микросфер (МС) из поливинилового спирта диаметром 0,2–0,6 мм в инфузионном объеме 0,4–0,9 мл направлено на обнаружение их особенностей, необходимых для доклинического изучения с хирургическим доступом к бедренной артерии. Были решены две проблемы: разработка методики внутриартериального (в/а) введения крысам и оценка эффективности в/а эмболизации на кроликах.

Эксперименты на крысах под общей анестезией проведены с МС диаметром 0,2–0,3 мм. Для доклинического изучения рекомендована методика с использованием крыс массой тела 120–150 г, инфузионной системы с катетером G26 и периодом наблюдения 7 дней, позволяющим контролировать эффективность эмболизации опухоли, перевитой в зону кровоснабжения.

Эксперименты на кроликах под общей анестезией проведены с МС диаметром 0,4–0,6 мм. С помощью рентгеноконтрастной визуализации показано, что применение МС независимо от объема в диапазоне 0,4–0,9 мл реализует выраженное, вплоть до полного, и длительное (не менее 14 дней) снижение интенсивности регионарного кровотока. Лучшие результаты эмболизации получены с катетером G20 в инфузионной системе. Локальные трофические изменения под действием МС (побочные эффекты) расценены как артефакт моделирования на кроликах, связанный с полным выключением кровотока в относительно мелком сосуде и нарушением иннервации конечности.

Анализ выявленных особенностей с подбором адекватных характеристик МС и инструментария, достигнутой эффективностью и осложнениями в/а эмболизации позволяет рекомендовать отработанную методику на крысах для доклинического изучения крупных МС, а сами МС считать перспективными для проведения эмболизации или химиоэмболизации опухоли.

Ключевые слова: крупные микросферы; методика; крысы; кролики; внутриартериальная эмболизация; кровоток; осложнения.

Для цитирования: Российский онкологический журнал. 2015; 20 (5): 40–43.

FEATURES OF TRANS-ARTERIAL EMBOLIZATION WITH LARGE MICROSPHERES OF RATS AND RABBITS

Jakunina M.N.¹, Fadeev A.S.², Kalishjan M.S.², Treshalina E.M.¹, Dolgushin M.B.¹

¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», 115478, Moscow, Russian Federation; ²Soviet Local Veterinary Clinic, 115201, Moscow, Russian Federation

Studying of large microspheres (MS) from polyvinyl alcohol with the diameter of (d) of 0.2–0.6 mm in the infusional volume of 0.4–0.9 ml is directed for detection of their features necessary for preclinical study with surgical access to a femoral artery. Two problems were solved: development of trans-arterial (t.a.) technique introductions to rats and efficiency assessment t.a. embolization on rabbits.

Experiments on the rats under general anesthesia are made with d=0.2–0.3 mm of MS. For preclinical study of the technique on rats with the body weight of 120–150 g, infusional system with catheter of G26 and period of observation within 7 days allowing to control efficiency of embolization of tumor intertwined in the blood supply zone is recommended.

Experiments on rabbits under general anesthesia are made with MS diameter of 0.4–0.6 mm of MS. By means of X-ray contrast visualization decrease in intensity of a regional blood-stream is shown expressed up to full and long (not less than 14 days) for all of the volumes of MS. The best results of embolization are received with G20 catheter in infusion system. Local trophic changes under the influence of MS (side effects) are regarded as modeling artifact on rabbits connected with full switch off of blood-groove in rather small vessel and violation of innervation of the extremity.

The analysis of the revealed features with selection of adequate characteristics of the ISS and tools reached efficiency and complications of trans-arterial embolization allows to recommend the fulfilled technique on rats for preclinical study of large ISS from polyvinyl alcohol, and to consider LMS perspective for trans-arterial embolization or chemo-embolization of tumor.

Key words: large microspheres; technique; rats; rabbits; trans-arterial embolization; blood stream; side effects.

Citation: Rossiiskii onkologicheskii zhurnal. 2015; 20 (5): 40–43. (In Russ.)

Correspondence to: Marina Jakunina – Doctor of veterinary medicine; e-mail: irsovet@yandex.ru.

Received 17.06.15

Внутриартериальная (в/а) эмболизация с применением микросфер (МС) из различных материалов используется в онкологии для локального (адресного) выключения кровотока и существенного сокращения солитарных опухолевых узлов вплоть до полного исчезновения [1–4].

Среди показаний в основном первичные неоперабельные или метастатические поражения печени, при которых лекарственная терапия, как правило, малоэффективна. При системной или в/а химиотерапии доксорубицином, гемцитабином или иринотеканом объективный эффект не превышает 20–30% из-за плохой биодоступности, связанной с особенностями кровотока в печени и кровоснабжения опухоли. Эмболизация улучшает эффективность лечения этой патологии, а нагруженные цитостатиками МС, особенно большой емкости и размеров (диаметр > 0,2 мм), используют также для в/а химиоэмболизации, позволяющей дополнительно повысить биодоступность лекарств за счет адресной доставки и пролонгирования времени контакта с опухолью [1, 2, 5].

Наиболее удобной моделью в эксперименте для изучения эффективности эмболизации с помощью МС служит выключение кровотока в зоне кровоснабжения регионарной артерии у кроликов под рентгенологическим контролем. Для доказательства специфической эффективности химиоэмболизации необходима оценка противоопухолевого действия с помощью лечебного патоморфоза на адекватной модели. В качестве таковой предложены перевиваемые опухоли крыс, среди которых гепатоцеллюлярный рак РС-1, растущий в мышцах бедра в зоне кровоснабжения бедренной артерии [6, 7]. Однако если введение крупных МС диаметром > 0,2 мм в регионарную артерию выполняется свободно кроликам, то для крыс это практически невозможно из-за относительно малого сечения бедренной артерии, составляющего всего 0,16 мм [8].

Таким образом, для доклинического изучения крупных МС актуально выявление особенностей в/а эмболизации под контролем рентгенологически доказанной эффективности на здоровых кроликах. Подготовка таких МС для в/а химиоэмболизации на модели опухоли крыс требует разработки адекватной методики введения в бедренную артерию. Соответственно сформулированы цель и задачи исследования.

Цель исследования – для проведения доклинического изучения крупных МС установить особенности в/а эмболизации на крысах и кроликах.

Задачи исследования:

1. Разработать методику введения МС диаметром 0,2–0,3 мм в бедренную артерию крыс.

2. Оценить эффективность в/а эмболизации бедренной артерии кроликов с помощью МС диаметром 0,4–0,6 мм.

Материал и методы

Исследование проведено на 10 беспородных крысах-самках массой тела 90–150 г из разведения РОНЦ

и питомника лабораторных животных «Столбовая» и на 6 кроликах-самцах породы «гигант» массой тела 1,0–1,5 кг из питомника «Крюково». Животных содержали в виварии РОНЦ в конвенциональных условиях.

Хирургический доступ к бедренной артерии (a. femoralis) крыс или кроликов выполняли под наркозом с помощью препарата золетил-100 (Virbac, Франция) при использовании соответствующего инструментария.

МС на основе криогеля поливинилового спирта диаметром 0,2–0,6 мм получали из лаборатории криохимии биополимеров Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН. МС мол. массой 86 кДа и степенью дезацелирования 100% приготовлены по методике криогранулирования при температуре -12°C из 9% водного раствора указанного полимера [9, 10]. Для исследований МС получали в сухом виде в эппендорфах различными объемами от 0,1 до 6 мл. К сухим МС добавляли физиологический раствор до получения 0,1% взвеси. Для проведения в/а инфузии взвесь МС дозировали по объему.

Взвесь МС вводили струйно с помощью инфузионной системы, составленной из внутривенного периферического катетера «бабочка» размера от G20 до G27 (Troge, Германия) и пластикового шприца 2 мл без иглы. Последовательность манипуляций приведена в разделе «Результаты».

Контролем результативности методики в/а введения крупных МС крысам служили состоятельность процедуры при разном диаметре и инфузионном объеме МС, катетерах различного сечения и массе тела, определяющей сечение и длину артерии, а также визуальная оценка патологических изменений тканей в зоне кровоснабжения регионарной артерии сразу и через 7–9 дней после введения.

Об эффективности эмболизации бедренной артерии кроликов судили по снижению сосудистого рисунка конечности сразу и через 2 нед после введения МС с помощью рентгеноконтрастной ангиографии. Использовали омнипак для внутрисосудистого введения (ДжиИ Хелскеа, Ирландия), который вводили в артерию дважды – до и после введения МС.

После завершения экспериментов животных умерщвляли с помощью передозировки эфирного наркоза при соблюдении гуманных методов обращения, принятых в РФ.

Результаты и обсуждение

При разработке методики введения МС диаметром 0,2–0,3 мм в бедренную артерию крыс использовали известную методику [10] в модификации для крупных МС (рис. 1):

- рассечение кожи бедра от паховой области до коленного сустава при медиальном доступе;
- выделение сосудисто-нервного пучка при тупой препаровке мягких тканей бедра;
- выделение бедренной артерии из сосудисто-нервного пучка;
- лигирование артерии на уровне верхней трети и поднятие ее на корнцанге;
- катетеризация артерии;
- введение взвеси МС через инфузионную систему;
- удаление катетера и лигирование артерии ниже области постановки катетера;
- ушивание кожи.

Для корреспонденции: Якунина Марина Николаевна – доктор ветеринарных наук, ст. науч. сотр. Лаборатории комбинированной терапии опухолей НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей; 115478, г. Москва, Каширское ш., д. 24, e-mail: irsoveta@yandex.ru.

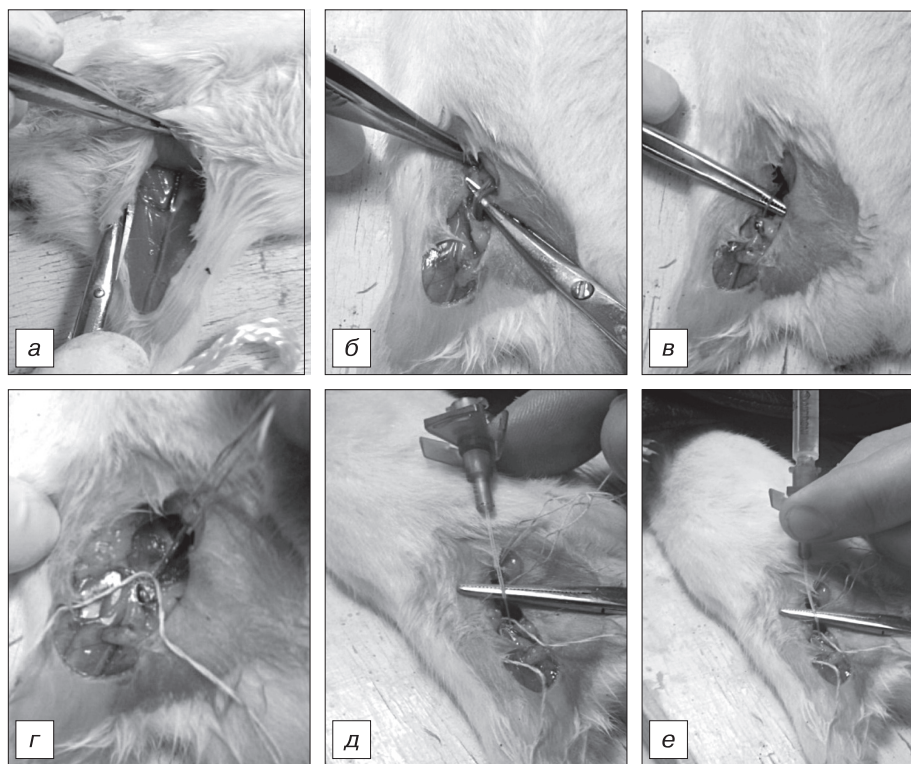


Рис. 1. Этапы подготовки и проведения внутриартериальной инфузии МС в бедренную артерию крыс (а–е).

а – кожный разрез на медиальной поверхности бедра крысы; б – сосудисто-нервный пучок бедра крысы; в – бедренная артерия крысы, выделенная из сосудисто-нервного пучка; г – лигированный проксимальный отдел и подготовительная лигатура в дистальном отделе артерии крысы; д – бедренная артерия крысы с периферическим катетером; е – инфузионная система для введения МС в бедренную артерию крысы.

Последовательная апробация катетеров «бабочка» различных размеров показала, что крысам массой тела 100–150 г инфузионная система с катетером G26 позволяет вводить тестируемые МС струйно и без ограничений. Представленные на рис. 1 манипуляции с использованием этого катетера обеспечивали успешное введение МС объемом 0,2–0,3 мл.

При меньшей массе тела крыс этот катетер был нестойким, у части крыс ($n = 2$) отмечали разрыв артерии в начале введения, у других ($n = 4$) – локальный некроз мягких тканей бедра на 9-е сутки после введения. Эти осложнения свидетельствуют о

несоответствии диаметра катетера сечению артерии, перерастяжении и нарушении целостности стенки сосуда при введении МС под давлением.

Полученные данные дают возможность считать апробированную методику адекватной поставленной задаче при условии использования катетера G26 для крыс массой тела 100–150 г.

При в/а эмболизации бедренной артерии кроликов с помощью инфузионной системы были апробированы катетеры размером G20. Оказалось, что именно эти катетеры позволяют струйно вводить МС объемом 0,4–0,9 мл заданного диаметра. У всех животных отмечено снижение сосудистого рисунка

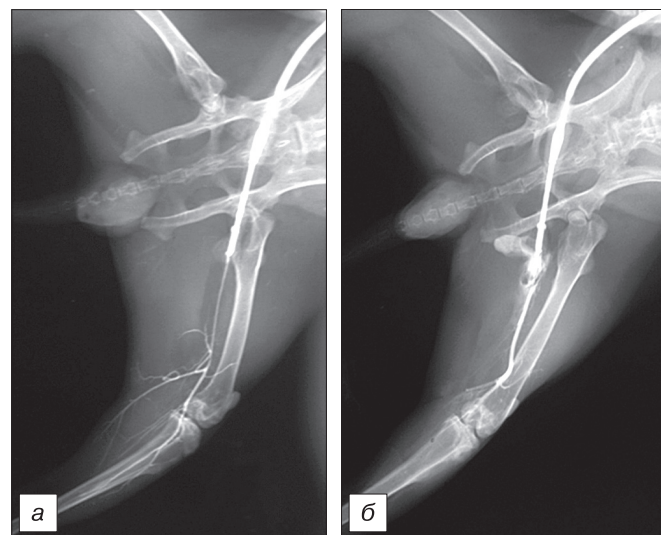


Рис. 2. Рентгеноконтрастная ангиография конечности кролика до (а) и сразу после (б) в/а введения МС.

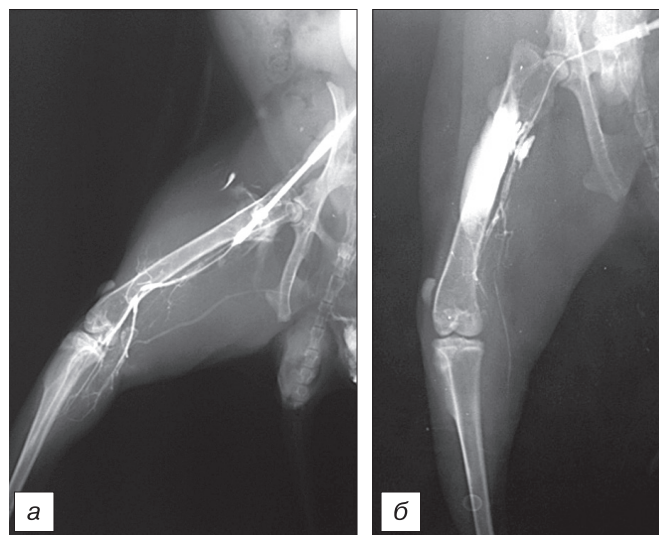


Рис. 3. Рентгеноконтрастная ангиография конечности кролика до (а) и через 2 нед после (б) в/а введения МС.

конечности сразу (рис. 2) и через 2 нед (рис. 3) после введения.

Анализ результатов эмболизации у кроликов показал, что при минимальном объеме взвеси МС 0,4 мл достигается практически полное выключение периферического кровотока в зоне кровоснабжения бедренной артерии (см. рис. 2). Увеличение объема МС до 0,9 мл не приводило к повышению эффективности эмболизации. Полученный эффект сохранялся в течение 14 дней после эмболизации (см. рис. 3).

Среди осложнений в/а эмболизации на 14-е сутки после введения МС у некоторых кроликов отмечали локальные абсцессы в месте катетеризации. В одном случае наблюдали сухой некроз конечности. Эти осложнения связаны с тесным контактом МС и сосудистой стенки при моделировании процесса.

Заключение

Изучение крупных МС из поливинилового спирта диаметром 0,2–0,6 мм в инфузионном объеме 0,4–0,9 мл направлено на обнаружение их особенностей, необходимых для доклинического изучения с хирургическим доступом к бедренной артерии. Были решены две проблемы: разработка методики в/а введения крысам и оценка эффективности в/а эмболизации на кроликах.

Эксперименты на крысах под общей анестезией проведены с МС диаметром 0,2–0,3 мм. Для доклинического изучения рекомендована методика с использованием крыс массой тела 120–150 г, инфузионной системы с катетером G26 и периодом наблюдения 7 дней, позволяющим контролировать эффективность эмболизации опухоли, перевитой в зону кровоснабжения.

Эксперименты на кроликах под общей анестезией проведены с МС диаметром 0,4–0,6 мм. С помощью рентгеноконтрастной визуализации показано, что применение МС независимо от объема в диапазоне 0,4–0,9 мл реализует выраженное, вплоть до полного, и длительное (не менее 14 дней) снижение интенсивности регионарного кровотока. Лучшие результаты эмболизации получены с катетером G20 в инфузионной системе. Локальные изменения трофики, наблюдавшиеся в прямой зависимости от диаметра МС (побочные эффекты), расценены как артефакт моделирования на кроликах, связанный с полным выключением кровотока в относительно мелком сосуде и нарушением иннервации конечности.

Анализ выявленных особенностей с подбором адекватных характеристик МС и инструментария, достигнутой эффективностью и осложнениями в/а эмболизации позволяет рекомендовать отработанную методику на крысах для доклинического изучения крупных МС, а сами МС считать перспективными для проведения эмболизации или химиоэмболизации опухоли.

ЛИТЕРАТУРА

1. Долгушин Б.И., Патютко Ю.И., Виршке Э.Р. Артериальная химиоэмболизация микросферами с доксорубицином (DC BEAD™) в лечении больных гепатоцеллюлярным раком (предварительные результаты). *Анналы хирургической гепатологии*. 2009; 2: 53–8.
2. Долгушин Б.И., Виршке Э.Р., Косырев В.Ю. Трансартериальная химиоэмболизация микросферами с доксорубицином в лечении неоперабельных больных гепатоцеллюлярным раком

- (отдаленные результаты). *Анналы хирургической гепатологии*. 2013; 4: 10–6.
3. Aliakparov M.T., Abishev B.Kh., Tazhibaev D.M., Pitel E.S. Results of uterine artery embolization in the treatment of symptomatic uterine myoma. *Vestn. Rentgenol. Radiol.* 2014; 6: 29–32.
4. Michelozzi C.I., Januel A.C., Cuvinciu V. Arterial embolization with Onyx of head and neck paragangliomas. *J. Hepat. Mon.* 2014; 14 (2): 25 788.
5. Eyol E., Boleij A., Taylor R.R., Lewis A.L., Berger M.R. Chemoembolisation of rat colorectal liver metastases with drug eluting beads loaded with irinotecan or doxorubicin. *J. Clin. Exp. Metast.* 2008; 25 (3): 273–82.
6. Райхлин Н.Т., Андронova Н.А., Герасимова Г.К. Морфологическая и биохимическая характеристика холангиоцеллюлярного рака PC-1 при подкожной и внутрипеченочной трансплантации. *Экспериментальная онкология*. 2001; 2: 126–30.
7. Bazin I.S. Hepatocellular carcinoma the current state of problem. *J. Pract. Oncol.* 2008; 9 (4): 216–28.
8. Большаков И.Н., Шестакова Л.А., Котиков А.Р. Экспериментальный атерогенез у крыс. Морфологическая реконструкция стенки магистральной артерии полисахаридными биополимерами. *Фундаментальные исследования. Биологические науки*. 2013; 10: 557–63.
9. Лозинский В.И. Криотропное гелеобразование растворов поливинилового спирта. *Успехи химии*. 1998; 67 (7): 641–55.
10. Savina I.N., Hanora A., Plieva F.M., Galaev I.Yu., Mattiasson B., Lozinsky V.I. Cryostructuration of polymer systems. XXIV. Poly (vinyl alcohol) cryogels filled with particles of strong anion exchanger. Properties of the composite materials and potential application. *J. Appl. Polym. Sci.* 2005; 95 (3): 529–38.
11. Андронova Н.В., Волконский М.В., Калишьян М.С., Трещалина Е.М. Методика внутриартериальной инфузии крысам с внутримышечно трансплантированной опухолью. *Российский биотерапевтический журнал*. 2012; 1 (1): 19–22.

REFERENCES

1. Dolgushin B.I., Patyutko Yu.I., Virshke E.R. Transarterial himioembolization inoperable patients with a gepatotsellyulyarny cancer (the remote results). *Annaly khirurgicheskoy gepatologii*. 2009; 2: 53–8. (in Russian)
2. Dolgushin B.I., Virshke E.R., Kosyrev V.Y. Transarterial chemoembolization with microspheres with doxorubicin in the treatment of inoperable patients with hepatocellular carcinoma (late results). *Annaly khirurgicheskoy gepatologii*. 2013; 4: 10–6. (in Russian)
3. Aliakparov M.T., Abishev B.Kh., Tazhibaev D.M., Pitel E.S. Results of uterine artery embolization in the treatment of symptomatic uterine myoma. *Vestn. Rentgenol. Radiol.* 2014; 6: 29–32.
4. Michelozzi C.I., Januel A.C., Cuvinciu V. Arterial embolization with Onyx of head and neck paragangliomas. *J. Hepat. Mon.* 2014; 14 (2): 25 788.
5. Eyol E., Boleij A., Taylor R.R., Lewis A.L., Berger M.R. Chemoembolisation of rat colorectal liver metastases with drug eluting beads loaded with irinotecan or doxorubicin. *J. Clin. Exp. Metast.* 2008; 25 (3): 273–82.
6. Raykhlin N.T., Andronova N.A., Gerasimova G.K. Morfologicheskaya i biokhimiya characteristic of a holangiotsellyulyarny cancer of RS-1 at hypodermic and intra hepatic transplantation. *Eksperimental'naya onkologiya*. 2001; 2: 126–30. (in Russian)
7. Bazin I.S. Hepatocellular carcinoma the current state of problem. *J. Pract. Oncol.* 2008; 9 (4): 216–28.
8. Bol'shakov I.N., Shestakova L.A., Kotikov A.R. Experimental atherogenez in rats. Morphological reconstruction of a wall of the main artery polisakharidny biopolymers. *Fundamental'nye issledovaniya. Biologicheskie nauki*. 2013; 10: 557–63. (in Russian)
9. Lozinskiy V.I. Kriotropony jellification of solutions of polyvinyl alcohol. *Uspekhi khimii*. 1998; 67 (7): 641–55. (in Russian)
10. Savina I.N., Hanora A., Plieva F.M., Galaev I.Yu., Mattiasson B., Lozinsky V.I. Cryostructuration of polymer systems. XXIV. Poly (vinyl alcohol) cryogels filled with particles of strong anion exchanger. Properties of the composite materials and potential application. *J. Appl. Polym. Sci.* 2005; 95 (3): 529–38.
11. Andronova N.V., Volkonskiy M.V., Kalish'yan M.S., Treshchalina E.M. A technique of intra arterial infusion to rats with vnutrimyshkchno the transplanted tumor. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal*. 2012; 1 (1): 19–22. (in Russian)

Поступила 17.06.15