

УДК 616.36.001.57–085.832.9

О.І. Дронов<sup>1</sup>, Д.І. Хоменко<sup>1\*</sup>, П.П. Бакунець<sup>2</sup>, В.В.Тетеріна<sup>1</sup>

## Температурні показники після кріовпливу, потенційованого дистильованою водою, на експериментальній моделі печінки свині за умов відсутності спланхнічного кровотоку

UDC 616.36.001.57–085.832.9

O.I. Dronov<sup>1</sup>, D.I. Khomenko<sup>1\*</sup>, P.P. Bakunets<sup>2</sup>, V.V. Teteryna<sup>1</sup>

## Temperature Changes During Cryoeffect Potentiated With Distilled Water Assessed in Porcine Liver Model Without Splanchnic Blood Flow

**Реферат:** Ефективність локального кріовпливу на патологічну ділянку тканини залежить від значень досягнутої температури на конкретній глибині. У даному дослідженні представлено результати порівняльного аналізу динаміки змін температури за показниками комплексу вимірювального інтраопераційного термодіагностичного чотириканального «КВІТ-4» на дискретних глибинах 3, 8, 13 та 18 мм. На експериментальній моделі печінки свині за умов відсутності спланхнічного кровотоку нами проведено два послідовні цикли локальної кріодії з попереднім введенням у паренхіму печінки дистильованої води (основна група) та без введення (контрольна група). Середня температура у тканині печінки тварин основної групи на глибині 3 мм від робочої поверхні кріоаплікатора наприкінці 10-ї хвилини другого циклу кріовпливу була на 36 градусів нижчою, ніж у контрольній (–85,2 та –49,2°C відповідно); на глибині 8 мм – нижчою на 52,5 градуса (–61,1 та –8,5°C відповідно); на глибині 13 мм – нижчою на 51,5 градуса (–59,5 та –3,0°C відповідно), на глибині 18 мм – нижчою на 40,4 градуса (–40,5 та –0,1°C відповідно). Введення дистильованої води в біологічну тканину за 5 хв до початку локального кріовпливу посилювало його ефективність, про що свідчило досягнення більш низьких температур у найбільш віддалених від робочої поверхні кріоаплікатора ділянках.

**Ключові слова:** кріодеструкція, локальний кріовплив, посилення кріодеструкції, дистильована вода, термодіагностика.

**Реферат:** Эффективность локального криовоздействия на патологический участок ткани зависит от значений достигнутой температуры на конкретной глубине. В данном исследовании представлены результаты сравнительного анализа динамики изменений температуры по показателям комплекса измерительного интраоперационного термодиагностического четырехканального «КВИТ-4» на дискретных глубинах 3, 8, 13 и 18 мм. На экспериментальной модели печени при отсутствии спланхического кровотока нами проведено два последовательных цикла локального криовоздействия с предварительным введением в паренхиму печени свиньи дистиллированной воды (основная группа) и без введения (контрольная группа). Средняя температура в ткани печени животных основной группы на глубине 3 мм от рабочей поверхности криоаппликатора в конце 10-й минуты второго цикла криовоздействия была на 36 градусов ниже, чем в контрольной (–85,2 и –49,2°C соответственно); на глубине 8 мм – ниже на 52,5 градуса (–61,1 и –8,5°C соответственно); на глубине 13 мм – ниже на 51,5 градуса (–59,5 и –3,0°C соответственно), на глубине 18 мм – ниже на 40,4 градуса (–40,5 и –0,1°C соответственно). Введение дистиллированной воды в биологическую ткань за 5 минут до начала локального криовоздействия усиливало его эффективность, о чем свидетельствовало достижения более низких температур в наиболее удаленных от рабочей поверхности криоаппликатора участках.

**Ключевые слова:** криодеструкция, локальное криовоздействие, усиление криодеструкции, дистиллированная вода, термодіагностика.

**Abstract:** The efficiency of local cryoeffect on pathological tissue area depends on the values of achieved temperature at a certain depth. This study presents the results on comparative analysis of the dynamics of temperature changes measured by intraoperative four-channel thermocouple unit KVIT-4 at discrete depths of 3, 8, 13 and 18 mm. We carried out two successive cycles of local cryoeffect with preliminary introduction of a distilled water into parenchyma of porcine liver (main group) and without any additional action (control group) in experimental model of porcine liver without splanchnic blood flow. The average temperature in animal liver tissue of the main group at a distance of 3 mm deep from the cryoapplicator operating surface was lower by 35 degrees at the end of the 10<sup>th</sup> min of cryoeffect of the 2nd cycle if compared with the control (–85.2 and –49.2°C, respectively), at a depth of 8 mm it was lower by 52.5 degrees (–61.1 and –8.5°C, respectively), at 13 mm this index was lower by 51.5 degrees (–59.5 and –3.0°C, respectively), and at 18 mm it was lower by 40.4 degrees (–40.5 and –0.1°C, respectively). An introduction of a distilled water into biological tissue 5 min prior to the initiation of local cryoeffect increased its effectiveness, as evidenced by the reaching of lower temperatures in the areas distant from the operating surface of the cryoapplicator.

**Key words:** cryodestruction, local cryoeffect, enhanced cryodestruction, distilled water, thermocouple.

<sup>1</sup>Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, кафедра загальної хірургії №1, м. Київ, Україна

<sup>2</sup>Київський міський центр хірургії захворювань печінки, підшлункової залози та жовчних шляхів ім. В.С. Земскова, м. Київ, Україна

<sup>1</sup>Bogomolets National Medical University, Department of General Surgery №1, Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup>V.S. Zemskov Kiev City Center of Surgery for Liver, Pancreas and Biliary Tract Diseases, Kyiv, Ukraine

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

бул. Т. Шевченка, 13, м. Київ, Україна 01601;  
тел.: (+38 044) 234-40-62, факс: (+38 044) 234-92-76,  
електронна пошта: doc.homenko@gmail.com

\*To whom correspondence should be addressed:

13, T. Shevchenko ave., Kyiv, Ukraine 01601;  
tel.:+380 44 234 40 62, fax: +380 44 234 92 76,  
e-mail: doc.homenko@gmail.com

Надійшла 10.05.2017

Прийнята до друку 24.07.2017

Received May, 10, 2017

Accepted July, 24, 2017

© 2017 O.I. Dronov et al., Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

На даний час одним із найбільш розповсюджених у хірургічній практиці методом абляції вважається кріодеструкція тканин. Великий внесок у розвиток даного методу зробили нейрохірург І. Купер та інженер А. Лі [5]. Вони розробили перший кріохірургічний апарат, холодним агентом у якому був скраплений азот [14]. У кріохірургії залишається ряд невирішених питань, одним із яких є розробка ефективного методу посилення локального кріовпливу, який може забезпечити повну деструкцію пухлинних клітин у заданому об'ємі тканин [1].

У сучасній кріохірургії використовують наступні методи посилення деструкції тканин: повторення циклів «заморожування-відтавання» [9]; введення в тканину розчину етамзилату натрію [2]; створення попередньої ішемії у тканині (судинна ізоляція [6], ендоваскулярна оклюзія судин, які живлять пухлину [10]); поєднання локальної кріодії з іншими фізичними методами (ультразвукове випромінювання [4], надвисокочастотне електромагнітне поле [10, 12]).

Слід зазначити, що наведені методи посилення локального кріовпливу не знайшли широкого застосування в клінічній практиці, зокрема в хірургії резектабельного раку підшлункової залози, крім повторення циклів кріовпливу. Однак цей спосіб не гарантує повної деструкції пухлинних клітин у заданому об'ємі тканини [16] та значно подовжує тривалість операції. У зв'язку з цим важливими є пошук та розробка ефективного методу потенціювання локального кріовпливу на біологічну тканину.

Результати першого [8] та другого [7] етапів нашого експериментального дослідження, яке виконувалося в 2016 р. на базі Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, дозволили припустити, що введення дистильованої води в біологічну тканину, зокрема пухлинну, за 5 хв до початку локального кріовпливу може потенціювати процес кріодеструкції за рахунок гідратації клітин внаслідок їх осмотичного набряку. Для підтвердження нашого припущення необхідно було провести дослідження *in vitro*.

Мета роботи – оцінка на експериментальній моделі динаміки змін температури на дискретних глибинах 3, 8, 13 та 18 мм під час локального кріовпливу при попередньому введенні в паренхіму печінки дистильованої води за умов відсутності спланхнічного кровотоку та проведення порівняльного аналізу отриманих даних.

### Матеріали та методи

Експериментальною моделлю було обрано печінку свині. Вилучений в день експерименту орган свині підігрівали в термостаті до температури 37°C. Досліджували дві групи зразків тканини печінки: контрольна (КГ) та основна (ОГ). Середня маса

Nowadays, the tissue cryodestruction is one of the most common surgical ablation practices [10]. The first cryosurgical device was based on using liquid nitrogen as a coolant [1]. Cryosurgery has a number of unresolved issues, one of those is the development of an effective method for strengthening a local cryoexposure, which could provide a complete destruction of tumor cells in a particular volume of tissues [7].

Contemporary cryosurgery involves the following methods of enhancing the tissue destruction: repetition of freeze-thawing cycles [4]; introduction into the tissue of sodium ethamzylate solution [2]; preliminary development of ischemia in a tissue (vascular isolation [15], endovascular occlusion of tumor-feeding vessels [12]); combination of local cryoexposure with other physical methods (ultrasound radiation [5], ultrahigh-frequency electromagnetic field (HF-EMF) [12, 13]).

It should be noted that the methods, enhancing a local cryoexposure have not been widely used in clinical practice, in particular in surgery of resectable pancreatic cancer, except repeating the cycles of cryoeffect. However, this method does not guarantee a complete destruction of tumor cells in a given tissue [16] and significantly extends the duration of surgery. In this regard, it is important to search and develop an effective method for potentiating a local cryoexposure on biological tissue.

The results of the first [8] and the second [9] stages of our experimental study, carried out in 2016 at the R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, enabled to suggest that an introduction of distilled water into a biological tissue, in particular a tumor, 5 min before the initiation of local cryoexposure, could potentiate a cryodestruction due to the hydration of cells, due to their osmotic oedema. Our assumption needed the confirmation by an *in vitro* study.

The research aim was to evaluate the dynamics of temperature changes in the experimental model at discrete depths of 3, 8, 13 and 18 mm during local cryoeffect after the preliminary introduction of distilled water into hepatic parenchyma without splanchnic blood flow and to comparatively analyze the obtained data.

### Materials and methods

The porcine liver was chosen as an experimental model. The organ was isolated at the day of experiment and warmed up to 37°C in thermostat right before the procedure. The control (CG) and main (MG) groups of hepatic tissue samples were studied. An average organ mass made ( $1,553 \pm 65.3$ ) g. Hepatic tissue samples of the CG ( $n = 3$ ) were exposed to cryoeffect without additional procedures, 20 ml of distilled water were injected into hepatic parenchyma samples of the MG ( $n = 3$ ). The temperature in hepatic tissue at



органа складала ( $1553 \pm 65,3$ ) г. Зразки тканини печінки КГ ( $n = 3$ ) піддавали кріовпливу без додаткових процедур, у ділянку зразків паренхіми печінки ОГ ( $n = 3$ ) вводили 20 мл дистильованої води. Температуру в тканині печінки на дискретних глибинах 3, 8, 13 та 18 мм від робочої поверхні кріоаплікатора визначали за допомогою комплексу вимірювального термопарного чотириканального «КВІТ-4», дослідний екземпляр якого було розроблено кафедрою загальної хірургії №1 спільно з ТОВ НВФ «Пульс» (Київ) [13]. Низькотемпературний локальний кріовплив здійснювали за допомогою універсальної кріохірургічної установки «Кріо-Пульс» (ТОВ НВФ «Пульс»). Застосовували кріоаплікатор із діаметром робочої поверхні 20 мм та температурою  $-180^{\circ}\text{C}$ , час експозиції кріовпливу складав 10 хв. Тканини печінки піддавали кріодеструкції з подвійним циклом та подальшим спонтанним відтаванням після 10-ої хвилини кріовпливу кожного циклу заморожування як із кріопотенціюванням розчином дистильованої води, так і за його відсутності.

До кріоаплікатора (С) щільно закріплювали тримач термопар (В) «КВІТ-4» (D) (рис. 1). Кріозонд фіксували в штативі таким чином, щоб усі термопари (3, 8, 13, 18 мм) комплексу «КВІТ-4» були введені під кутом  $90^{\circ}$  (по відношенню до поверхні Глісонової капсули) в праву латеральну частку печінки свині (А). Кожна термопара реєструвала температуру на відповідній дискретній глибині: Т1 – 3 мм, Т2 – 8 мм, Т3 – 13 мм, Т4 – 18 мм. Забезпечували щільний контакт робочої поверхні кріоаплікатора з поверхнею печінки. Висота частки печінки в проекції введення термопар складала не менше 3,0 см. Експеримент повторювали тричі. Процес термометрії під час локального кріовпливу представлено на рис. 1.

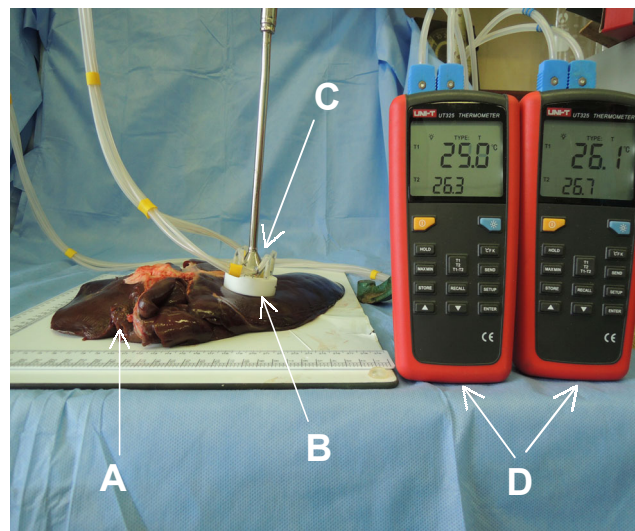
У якості дистильованої води застосовували стерильну «Воду для ін'єкцій», яка виготовляється шляхом обов'язкової дистиляції ПрАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця» (м. Київ, Україна) та внесена до Державної фармакопеї України [3].

Для статистичної обробки даних використовували програмне забезпечення «IBM SPSS Statistics 22» (США) та метод ANOVA. Результати реєстрації температур у КГ та ОГ за показниками термопар Т1, Т2, Т3 та Т4 комплексу «КВІТ-4» представляли у вигляді середнього значення ( $M$ ) та похибки середнього значення ( $m$ ).

Для порівняння середніх показників температур у зразках тканини печінки в КГ та ОГ різницю вважали статистично значущою при  $p < 0,05$ .

### Результати та обговорення

На основі отриманих температурних даних побудовано графіки змін температур на дискретних



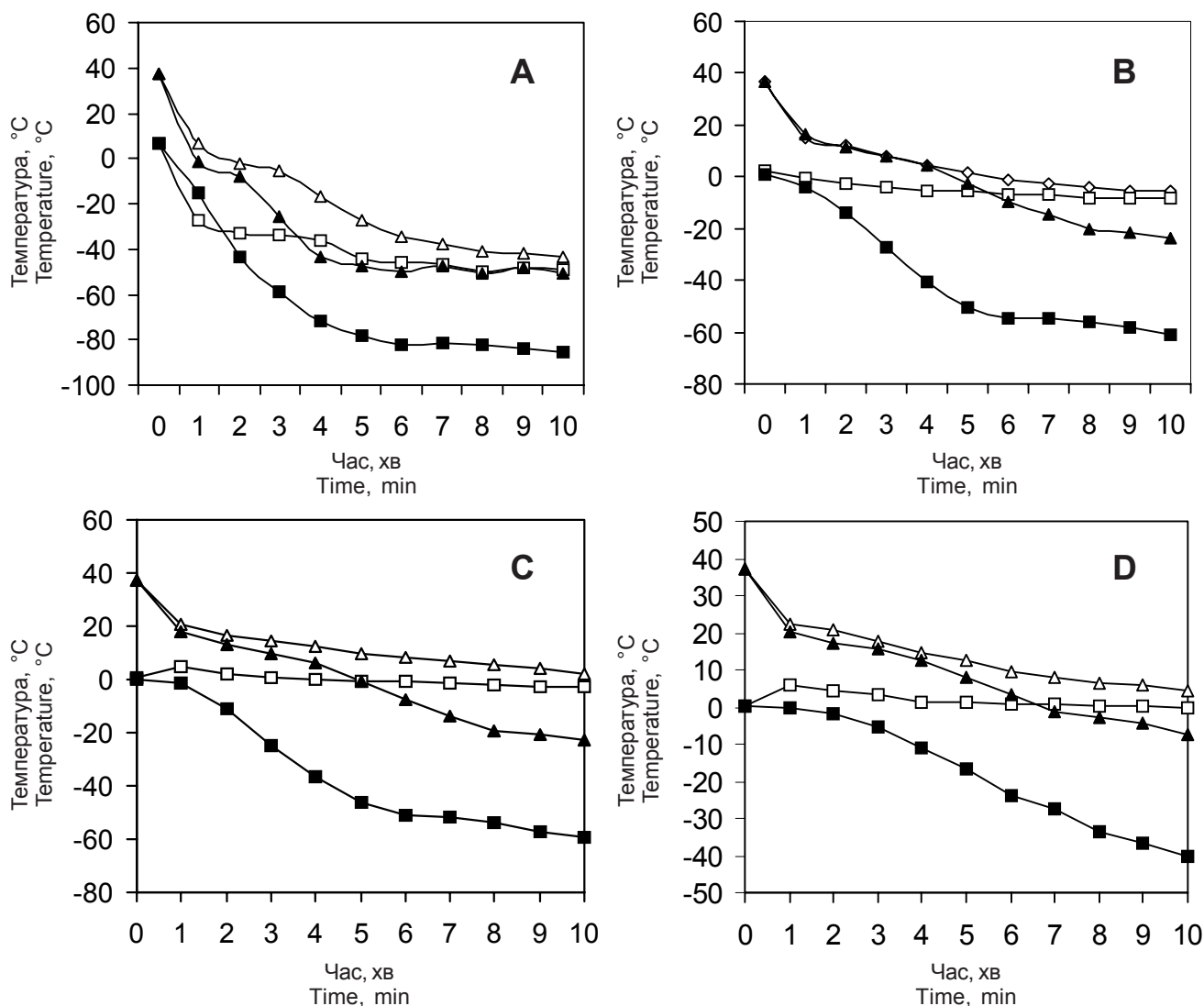
**Рис. 1.** Процес термометрії на дискретних глибинах у тканині печінки свині під час кріодеструкції: А – печінка свині; В – тримач термопар; С – кріоаплікатор; D – електронні термометри комплексу «КВІТ-4».

**Fig. 1.** Design of thermometry at discrete depths in porcine hepatic tissue during cryodestruction: A – porcine liver; B – thermocouple holder; C – cryoapplicator; D – electronic thermometers of the Kvit-4 unit.

discrete depths of 3, 8, 13 and 18 mm from the operating surface of cryoapplicator was determined using intraoperative four-channel thermocouple Kvit-4, developed by the Department of General Surgery №1 mutually with the Pulse Research and Production Company (Kyiv) [3]. Local cryoeffect was performed using the cryosurgical unit Cryo-Pulse (Pulse, Kyiv). The cryoapplicator had a working surface of 20 mm and a temperature of  $-180^{\circ}\text{C}$ , the time of cryoexposure was 10 min. The hepatic tissues were exposed to a double cycle of cryodestruction and the following spontaneous thawing after the 10<sup>th</sup> min of cryoexposure for each freezing cycle, both with the cryopotentialization by a solution of distilled water and without the procedure.

The holder of thermocouples (B) (Fig. 1) of device (D) was tightly fixed to the cryoapplicator (C). The cryoprobe was fixed in a tripod so that all the thermocouples (3, 8, 13, 18 mm) of the Kvit-4 unit were introduced at an angle of  $90^{\circ}$  (to the surface of the Glisson's capsule) into the right lateral lobe of porcine liver (A). Each thermocouple recorded the temperature at an appropriate discrete depth: T1 – 3 mm, T2 – 8 mm, T3 – 13 mm, T4 – 18 mm. Tight contact of cryoapplicator working area with liver surface was provided. The height of liver part in the projection of thermocouples introduction was more than 3.0 cm. The experiment was repeated three times. The thermometry design during local cryoexposure is presented in Fig. 1.





**Рис. 2.** Зміни температур за показниками термопар Т1(А), Т2(В), Т3(С), Т4(Д) від робочої поверхні кріоаплікатора в печінці свині: □, △ – криві зниження температур без кріопотенціювання при першому та другому циклах кріовпливу відповідно; ▲, ■ – криві зниження температур із кріопотенціюванням дистильованою водою під час першого та другого циклів кріовпливу відповідно.

**Fig. 2.** Temperature changes according to thermocouples indices T1(A), T2(B), T3(C), T4(D): □, △ – curves of temperature decrease without cryopotentialization during the 1<sup>st</sup> and the 2<sup>nd</sup> cycles of cryoexposure, respectively; ▲, ■ – curves of temperature decrease with cryopotentialiation by distilled water during the 1<sup>st</sup> and the 2<sup>nd</sup> cycles of cryoexposure, respectively.

глибинах 3, 8, 13 та 18 мм у КГ та ОГ протягом першого та другого циклів кріовпливу (рис. 2).

Порівняння середніх значень температур, отриманих за показниками першої термопари в КГ та ОГ на глибині 3 мм протягом першого циклу кріовпливу, показало, що у ОГ із 1-ї та до 10-ї хвилини включно показники температур були значуще меншими, ніж у КГ ( $p < 0,001$ ). Наприкінці 1-ї хвилини другого циклу кріовпливу досягнута температура в КГ була статистично значуще нижчою, ніж в ОГ ( $p < 0,001$ ). На рис. 2 відмічено перехрест кривих 2 та 4 між 1- та 2-ю хвилинами кріовпливу. Після перехресту кривих в ОГ досягнуто значуще нижчі показники температур з 2- та до 10-ї хвилини кріовпливу включно ( $p < 0,001$ ).

As a distilled water, we used commercial sterile Water for Injections, which is produced by mandatory distillation by the Darnitsa Pharmaceutical Plant (Kyiv, Ukraine) and is listed in the State Pharmacopoeia of Ukraine [14].

The data were statistically processed using IBM SPSS Statistics 22 (USA) software and ANOVA. The results of temperature recording in the CG and MG according to the parameters of thermocouples T1, T2, T3 and T4 of the KVIТ-4 unit were presented as the mean value ( $M$ ) and mean error ( $m$ ).

To compare the mean values of temperatures in the specimens of hepatic tissue in the CG and MG, the difference was considered as statistically significant at  $p < 0.05$ .

Середні значення температур за показниками T2 в обох групах на глибині 8 мм протягом першого циклу кріовпливу мали наступні відмінності: наприкінці 1-ї хвилини кріовпливу температура в КГ була значуще вища, ніж в ОГ ( $p = 0,04$ ); наприкінці 2-ї хвилини кріовпливу значущої різниці між температурами в обох групах не виявлено ( $p = 0,511$ ); наприкінці 3-ї хвилини кріовпливу значущої різниці між отриманими температурами в КГ та ОГ не встановлено ( $p = 0,866$ ); наприкінці 4-ї хвилини кріовпливу значущої різниці між отриманими температурами в обох групах не виявлено ( $p = 0,479$ ). В ОГ було досягнуто нижчі показники температур з 5- та до 10-ї хвилини кріовпливу включно ( $p < 0,001$ ).

Аналіз середніх температурних значень за показниками T2 (на глибині 8 мм) протягом другого циклу кріовпливу показав, що в ОГ з 1- та до 10-ї хвилини включно показники температури були нижчі, ніж у КГ ( $p = 0,003$  для 1-ї хвилини кріовпливу та  $p < 0,001$  для температур у діапазоні часу другого циклу кріовпливу з 2- до 10-ї хвилини включно).

В ОГ протягом першого циклу кріовпливу значення середньої температури за показниками T3, яку встановлено на глибині 13 мм, починаючи з 1-ї та до 10-ї хвилини включно були нижчі, ніж у КГ ( $p = 0,004$  для 1-ї хвилини кріовпливу;  $p = 0,005$  для 2-ї хвилини кріовпливу;  $p = 0,003$  для 3-ої хвилини кріовпливу; для температур у діапазоні часу першого циклу кріовпливу з 4-ї по 10-ту хвилину включно  $p < 0,001$ ).

Під час порівняння отриманих середніх значень температур у КГ та ОГ за показниками T3 на глибині 13 мм протягом другого циклу кріовпливу було виявлено, що в ОГ, починаючи з 1- та до 10-ї хвилини включно, температури були нижчі, ніж у КГ ( $p < 0,001$ ).

Аналіз середніх значень температур у КГ та ОГ за показниками T4 на глибині 18 мм протягом першого циклу кріовпливу виявив, що в ОГ з 1-ої по 3-тю хвилину та з 6-ї по 10-ту хвилину кріовпливу включно досягаються температури нижчі, ніж у КГ (для 1-ї хвилини  $p = 0,044$ ; для 2-ї хвилини  $p = 0,003$ ; для 3-ї хвилини  $p = 0,037$ ; з 6-ї по 10-ту хвилину  $p < 0,001$ ). Значущої різниці показників середніх температур між КГ та ОГ тільки наприкінці 4- та 5-ї хвилин кріовпливу першого циклу не було виявлено (для 4-ї хвилини  $p = 0,15$ ); для 5-ї хвилини  $p = 0,062$ ).

Середні температури, що були зареєстровані за показниками T4, встановленої на глибині 18 мм від робочої поверхні кріоаплікатора, протягом другого циклу кріовпливу з 1- до 10-ї хвилини включно в ОГ були нижчі порівняно з КГ ( $p < 0,001$ ). Слід звернути увагу на другу криву динаміки зниження температур: протягом 10-ї хвилини кріо-

## Results and discussion

On the basis of the obtained temperature data we plotted the curves of temperature changes at discrete depths of 3, 8, 13 and 18 mm in CG and MG during the first and second cycles of cryoexposure (Fig. 2).

The comparison of the temperature mean values obtained with the 1<sup>st</sup> thermocouple in the CG and MG at a depth of 3 mm during the 1<sup>st</sup> cycle of cryoexposure showed that in the MG from the 1<sup>st</sup> to the 10<sup>th</sup> min inclusively the temperature indices were significantly lower than in the CG ( $p < 0.001$ ). At the end of the 1<sup>st</sup> min of the 2<sup>nd</sup> cycle of cryoexposure, the achieved temperature in the CG was significantly lower than in the MG ( $p < 0.001$ ). In Fig. 2, an intersection of the curves 2 and 4 between the 1<sup>st</sup> and the 2<sup>nd</sup> min of cryoexposure was noted. After crossing the curves the significantly lower temperature indices from the 2<sup>nd</sup> to the 10<sup>th</sup> min of cryoexposure inclusively were achieved in the MG ( $p < 0.001$ ).

The temperature mean values by the T2 in both groups at a depth of 8 mm during the 1<sup>st</sup> cycle of cryoexposure had the following differences: at the end of the 1<sup>st</sup> min of cryoexposure the temperature in the CG was significantly higher than in the MG ( $p = 0.04$ ); at the end of the 2<sup>nd</sup> min no significant difference between the temperatures in both groups was revealed ( $p = 0.511$ ); at the end of the 3<sup>rd</sup> min, no significant difference between the obtained temperatures in the CG and the MG was found ( $p = 0.866$ ); at the end of the 4<sup>th</sup> min, no significant difference between the obtained temperatures in both groups was observed ( $p = 0.479$ ). In the MG the lower temperatures were achieved from the 5<sup>th</sup> to the 10<sup>th</sup> min of cryoexposure inclusively ( $p < 0.001$ ).

The analysis of mean temperature values by the T2 (at 8 mm depth) during the 2<sup>nd</sup> cycle of cryoexposure showed that in the MG from the 1<sup>st</sup> to the 10<sup>th</sup> min inclusively, the temperature indices were lower than in the CG ( $p = 0.003$  for the 1<sup>st</sup> min of cryoexposure and  $p < 0.001$  for the temperatures of the 2<sup>nd</sup> cycle of cryoexposure within the range from the 2<sup>nd</sup> to the 10<sup>th</sup> min inclusively).

In the MG during the 1<sup>st</sup> cycle of cryoexposure the mean temperature values by the T3 which were established at a depth of 13 mm, from the 1<sup>st</sup> and up to the 10<sup>th</sup> min inclusively, were lower than in the CG ( $p = 0.004$  for the 1<sup>st</sup> min of cryoexposure;  $p = 0.005$  for the 2<sup>nd</sup> min;  $p = 0.003$  for the 3<sup>rd</sup> min; for the temperatures of the 1<sup>st</sup> cycle of cryoexposure within the range of the time from the 4<sup>th</sup> to the 10<sup>th</sup> minute inclusively  $p < 0.001$ ).

When comparing the obtained temperature mean values in the CG and the MG by the T3 at a depth of 13 mm during the 2<sup>nd</sup> cycle of cryoeffect, it was found that in the MG, from the 1<sup>st</sup> to the 10<sup>th</sup> min inclusively, the temperatures were lower than in the CG ( $p < 0.001$ ).



впливу другого циклу без кріопотенціювання температура не досягала значень, нижчих за  $-0,1^{\circ}\text{C}$  (рис. 2, С).

Під час аналізу отриманих результатів важливо було виявити значущу різницю показників середніх температур, зафіксованих наприкінці 10-ї хвилини другого циклу кріовпливу, між КГ та ОГ.

По відношенню до початкового значення температури тканини печінки свині ( $37^{\circ}\text{C}$ ) було встановлено, що в ОГ на глибині 3 мм від робочої поверхні кріоаплікатора наприкінці 10-ї хвилини другого циклу кріовпливу середня температура була нижчою на 36 градусів, ніж у КГ, на глибині 8 мм – нижчою на 52,5 градуса, на глибині 13 мм – нижчою на 51,5 градуса, ніж у КГ та на глибині 18 мм – нижчою на 40,4 градуси.

Таким чином було встановлено, що в ОГ, де за 5 хв до початку локального кріовпливу в паренхіму печінки свині вводили дистильовану воду, наприкінці 10-ї хвилини першого та другого циклів кріовпливу на всіх дискретних глибинах (3, 8, 13 та 18 мм) отримано значуще нижчі середні значення температур, ніж у КГ ( $p < 0,001$ ).

Оскільки мішенню під час кріодеструкції є вода, то найбільшому холодовому пошкодженню піддаються тканини зі значним її вмістом. В.В. Шафранов [11] виділяє три умовні типи води, яка міститься в тканинах, що піддаються кріодеструкції: 1) вільна вода (перетворюється в лід при температурі від 0 до  $-15^{\circ}\text{C}$ ); 2) зв'язана вода двох типів: слабо зв'язана вода (перетворюється в лід у діапазоні мінусових температур від  $-15^{\circ}\text{C}$ ), щільно зв'язана (незамерзаюча) вода (лід не утворюється, навіть при  $-200^{\circ}\text{C}$ ).

Саме вміст вільної та слабо зв'язаної води в тканині визначає її толерантність до кріопошкодження. Механізм посилення локального кріовпливу на біологічну тканину шляхом попереднього введення в неї дистильованої води обумовлений фізико-хімічними властивостями води. Дистильована вода є гіпотонічним розчином по відношенню до цитоплазми клітин, тому її введення в ділянку тканини, яка піддається локальному кріовпливу, за рахунок осмосу та дифузії спричиняє рух води в напрямку інтрацелюлярного вмісту, і, як наслідок, викликає гідrataцію клітин. Інтрацелюлярні кристали льоду, що утворюються в клітинах біологічної тканини під час заморожування, продовжують зростати в період спонтанного відтавання циклу кріофіксації за рахунок процесу «рекристалізації». Вільна інтрацелюлярна вода під час локального кріовпливу стає додатковим джерелом утворення кристалів льоду, які необоротно пошкоджують мембрану, ядро, органели клітини [15]. А сама гідrataція біологічної тканини, в тому числі пухлинної, призводить до більш глибокого зміщення ізотерм

The analysis of temperature mean values in the CG and the MG by T4 indices at a depth of 18 mm during the 1<sup>st</sup> cycle of cryoexposure revealed that in the MG from the 1<sup>st</sup> to the 3<sup>rd</sup> min and from the 6<sup>th</sup> to 10<sup>th</sup> min of cryoexposure inclusively the temperatures were lower than in the CG ( $p = 0.044$  for the 1<sup>st</sup> min;  $p = 0.003$  for the 2<sup>nd</sup> min;  $p = 0.037$  for the 3<sup>rd</sup> min;  $p < 0.001$  from the 6<sup>th</sup> to the 10<sup>th</sup> min). No significant difference of temperature mean values between the CG and the MG was revealed only before the end of the 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> min of the 1<sup>st</sup> cycle of cryoexposure ( $p = 0.15$  for the 4<sup>th</sup> min); for the 5<sup>th</sup> min  $p = 0.062$ ).

The average temperatures recorded by the T4 indices, established at a depth of 18 mm from the operating surface of the cryoapplicator, during the 2<sup>nd</sup> cycle of cryoexposure from the 1<sup>st</sup> to the 10<sup>th</sup> min inclusively in the MG were lower if compared with the CG ( $p < 0.001$ ). The attention should be paid to the 2<sup>nd</sup> curve of dynamics of temperature decrease. During the 10<sup>th</sup> min of cryoeffect of the 2<sup>nd</sup> cycle without cryopotentialiation the temperature did not approach the values below  $-0.1^{\circ}\text{C}$  (Fig. 2C).

When analyzing the obtained results, it was important to reveal a significant difference of the mean temperature indices recorded at the end of the 10<sup>th</sup> min of the 2<sup>nd</sup> cycle of cryoexposure, between the CG and the MG.

Comparing to the initial values of the temperature of porcine hepatic tissue ( $37^{\circ}\text{C}$ ), it was found that in the MG at a depth of 3 mm from the working surface of the cryoapplicator at the end of the 10<sup>th</sup> min of the 2<sup>nd</sup> cycle of cryoexposure, the average temperature was lower by 36 degrees than in the CG, at a depth of 8 mm it was below by 52.5 degrees, at a depth of 13 mm the difference was 51.5 degree and at a depth of 18 mm this made 40.4 degrees.

Thus, it was found that in the MG, where 5 min prior to a local cryoexposure, the distilled water was introduced into porcine liver parenchyma, at the end of the 10<sup>th</sup> min of the 1<sup>st</sup> and the 2<sup>nd</sup> cycles of cryoexposure at all the discrete depths (3, 8, 13 and 18 mm) the significantly lower average values of temperatures were obtained if compared with the CG ( $p < 0.001$ ).

During cryodestruction the tissues with significant water content are exposed to the strongest damage. V.V. Shafranov [11] distinguished three conditional types of water, composing the tissues exposed to cryodestruction: 1) free water (frozen at the temperature from 0 to  $-15^{\circ}\text{C}$ ); 2) bound water of two types: weakly bound water (frozen within the range of temperatures down to  $-15^{\circ}\text{C}$ ), tightly bound (non-freezing) water (ice is not formed even at  $-200^{\circ}\text{C}$ ).

The content of free and weakly bound water in the tissue determines its resistance to a low temperature damage. The mechanism of enhancing the local



критичної температури крипошкодження за рахунок збільшення холодопровідності.

Потребуються подальші дослідження впливу дистильованої води, введеної в біологічну тканину перед початком проведення локального кріовпливу, зокрема на експериментальних моделях переви-тих солідних пухлин *in vivo*. Під час локального кріовпливу залишається не вивченим характер температурних та морфологічних змін у солідній зло-якісній пухлині на дискретних глибинах при попе-редньому її введенні в тканину дистильованої води.

### Висновки

Введення в біологічну тканину дистильованої води за 5 хв до початку локального кріовпливу за умов відсутності спланхнічного кровотоку чинить потенціуючий ефект, який проявляється в досягненні більш низьких температур у найбільш відда-лених від робочої поверхні кріоаплікатора ділянках.

*Подяку висловлюємо академіку НАН України В.Ф. Чехуну та адміністрації Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України за надання можливості проведення експериментальної частини дослідження на базі Інституту.*

### Література

1. Гольцев А.Н., Дябина О.А., Останков М.В. и др. Стволовые раковые клетки в патогенезе опухолевого процесса после криодеструкции // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, №23. – С. 205–218.
2. Дегтев М.В., Кожевников Е.В., Кожевников В.А. Способ криодеструкции бородавок и гемангиом с использованием этиламзилата натрия // Вестник дерматологии и венерологии. – 2011. – № 1. – С. 69–72.
3. Державна Фармакопея України: в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – Харків: ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. – Т. 2. – 724 с.
4. Есьман С.С., Рикберг А.Б., Бакай Э.А. и др. Поиск *in vitro* оптимальных для криодеструкции параметров ультразвука // Проблемы криобиологии. – 1998. – №2. – С. 22–26.
5. Кубышкин В.А., Ионкин Д.А., Кунгурцев С.В., Чжао А.В. История криохирургии // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2015. – № 5. – С. 62–74.
6. Таболиновская Т.Д., Пустынский И.Н. Анализ эффективности криогенного метода лечения рака языка // Опухоли головы и шеи. – 2014. – №1. – С. 15–23.
7. Хоменко Д.І., Лук'янова Н.Ю., Оношко М.М., Козачук Є.С. Результати дослідження морфологічних змін клітин карциноми Герена в залежності від часу експозиції в розчині дистильованої  $H_2O$  // Матеріали 40-ої наук.-практ. конф. молод. вчених НМАПО ім. П.Л. Шупика – К., 2017. – С. 91–93.
8. Хоменко Д.І., Лук'янова Н.Ю., Козачук Є.С. Результати дослідження процесу локальної кріодії на експериментальних моделях розчинів 36%  $NaCl$ , дистильованої  $H_2O$  та 0,9%  $NaCl$  та перспективи їх застосування при проведенні

cryoeffect on a biological tissue by a preliminary introduction of distilled water into it is associated with the physical-chemical properties of water. Distilled water is a hypotonic solution in relation to the cell cytoplasm, therefore, its introduction into the tissue area, exposed to local cryoexposure, leads to the movement of water into the cells due to osmosis and diffusion, and as a result causes the cell hydration. The intracellular crystals of ice formed in the cells of biological tissue during freezing continue their growth during a spontaneous thawing due to the re-crystallization. Free intracellular water during a local cryoexposure becomes an additional source for the formation of ice crystals, which irreversibly damage the cell membrane, nucleus, and organelles [6]. The hydration of biological tissue *per se*, in particular tumor, leads to a deeper shift of isotherms of critical temperature of cryodamage due to the increase of a cold conductivity.

There is a need in future investigations of the effects of a distilled water introduced into biological tissue prior to a local cryoexposure, including *in vivo* experimental models of solid tumors. The nature of temperature and morphological changes in a solid malignant tumor during local cryoexposure at discrete depths with the preliminary introduction of distilled water into its tissue remains to be studied.

### Conclusions

Introduction of distilled water to biological tissue 5 min prior to an initiation of local cryoexposure without splanchnic blood flow had a potentiating effect, manifesting in development of lower temperatures in the zones being distant from the cryoapplicator operating surface.

*The authors acknowledge Academician of the National Academy of Sciences of Ukraine Vasyl F. Chekhun and the administration of R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of the National Academy of Sciences of Ukraine for the possibility of carrying out an experimental part of the research at the Institute.*

### References

1. Cooper I.S., Lee A. Cryostatic congelation: a system for producing a limited controlled region of cooling or freezing of biologic tissues. *J Nerv Ment Dis* 1961; 133(3): 259–263.
2. Degtev M.V., Kozhevnikov E.V., Kozhevnikov V.A. The method of warts and hemangiomas cryodestruction using sodium etamzylate. *Vestnik Dermatologii Venerologii* 2011; (1): 69–72.
3. Dronov O.I., Khomenko D.I., Leshchenko V.M., inventors. Measuring intraoperative thermocouple four-channel complex (MITC-4). Patent of Ukraine № 116730 9 MPC A 61 V 18/02. 2017 June 12.
4. Chzhao A.V., Chekmareva I.A., Paklin O.V. et al. Early morphological changes of hepatocytes after cryodestruction. *Journal of Anatomy and Histopathology* 2017; 6(1): 109–114.



- криофіксації солідних пухлин підшлункової залози // Матеріали конф., присвяченій 60-річчю ТДМУ: Здобутки клінічної та експериментальної медицини 14 червня 2017 р. – Тернопіль: ТДМУ, 2017. – С. 182–184.
9. Чжао А.В., Чекмарева І.А., Паклина О.В. и др. Ранние морфологические изменения в клетках печени при криодеструкции // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2017. – Т. 6, №1. – С. 109–114.
  10. Шафранов В.В., Борхунова Е.Н., Таганов А.В. и др. Современные технологии лечения больших ангиом критической локализации у детей // Альманах клин. медицины. – 2008. – Т. 2, №17. – С. 287–288.
  11. Шафранов В.В., Борхунова Е.Н., Костылев М.А. и др. Механизм разрушения биологических тканей при локальной криодеструкции // Вестник рос. акад. естеств. наук. – 2012. – №1. – С. 68–77.
  12. Шафранов В.В., Тен Ю.В., Резницкий В.И. и др. СВЧ- и криовоздействие на биоткани в эксперименте и клинике // Криобиология. – 1988. – №2. – С. 38–42.
  13. Пат. №116730, Україна, 9 МПК А 61 В 18/02. Комплекс вимірювальний інтраопераційний термопарний чотириканальний (КВІТ-4) / О.І. Дронов, Д.І. Хоменко, В.М. Лещенко та ін.; заявник та патентовласник О.І. Дронов. – № а201603076; заявл. 25.03.16; опубл. 12.06.17, Бюл. №11.
  14. Cooper I.S., Lee A. Cryostatic congelation: a system for producing a limited controlled region of cooling or freezing of biologic tissues // J. Nerv. Ment. Dis. – 1961. – Vol. 133, №3. – P. 259–263.
  15. Gage A.A., Baust J. Mechanisms of tissue injury in cryosurgery // Cryobiology. – 1998. – Vol. 37, №3. – P. 171–186.
  16. Yu Q., Yi G., Zhao G., Zhang Y. Effect of vascular network and nanoparticles on heat transfer and intracellular ice formation in tumor tissues during cryosurgery // CryoLetters. – 2014. – Vol. 35, №2. – С. 95–100.
  17. Esman S.S., Rickberg A.B., Bakay E.A. et al. In vitro search for ultrasonic parameters optimal for cryosurgery. Problems of Cryobiology 1998; (2): 22–26.
  18. Gage A.A., Baust J. Mechanism of tissue injury in cryosurgery. Cryobiology 1998; 37(3): 171–186.
  19. Goltsev A.N., Diabina O.A., Ostankov M.V. et al. Cancer stem cells in tumor pathogenesis after cryoablation. Probl Cryobiol Cryomed 2015; 25(3): 205–218.
  20. Khomenko D.I., Lukyanova N.Yu., Kozachuk E.S. Study results of local cryosurgery in experimental models of 36% NaCl, distilled H<sub>2</sub>O and 0,9% NaCl and prospects of their use during cryofixation of pancreas solid tumors. Advancements in Clinical and Experimental Medicine: Proc. of Scientific Conference Devoted to the 60th Anniversary of I. Horbachevsky Ternopil State Medical University; 2017 June 14; Ternopil: TSMU; 2017: 182–184.
  21. Khomenko D.I., Lukyanova N.Yu., Onoshko M.M., Kozachuk E.S. Study results of morphological changes of Guerin carcinoma cells depending on the exposure time in distilled H<sub>2</sub>O solution. Proc. of Scientific Conference of Young Scientists devoted to the 40th Anniversary of Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education; 2017 May 18; Kyiv; 2017: 91–93.
  22. Kubyshkin V.A., Ionkin D.A., Kungurtsev S.V., Chzhao A.V. History of cryosurgery. Khirurgiya. Zhurnal im N.I. Pirogova 2015; (5): 62–74.
  23. Shafranov V.V., Borkhunova E.N., Kostylev M.A. et al. The mechanism of destruction of biological tissue at a local cryodestruction. Vestnyk Rossiyskoy Akademii Estestvennykh Nauk 2012; (1): 68–77.
  24. Shafranov V.V., Borhunova E.N., Taganov A.V. et al. Modern treatment technologies of large angiomas with critical localization in children. Al'manah Klinicheskoy Meditsiny 2008; 17(2): 287–288.
  25. Shafranov V.V., Ten Yu.V., Reznitsky V.I. et al. UHF and cryoeffect on biological tissues in experiment and clinics. Cryobiology 1988; (3): 38–42.
  26. State Pharmacopoeia of Ukraine / 2nd ed. – Kharkiv: State Enterprise 'Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Quality of Medicinal Products'; 2014; 2: 724 p.
  27. Tabolinovskaya T.D., Pustynsky I.N. Analysis of the efficiency of cryogenic treatment for tongue cancer. Head and Neck Tumors 2014; (1): 15–23.
  28. Yu Q., Yi G., Zhao G., Zhang Y. Effect of vascular network and nanoparticles on heat transfer and intracellular ice formation in tumor tissues during cryosurgery. Cryo Letters 2014; 35(2): 95–100.

