

Процедура криоабляции: сдвиг фазы апоптоза и криосенсибилизация

Дж.Дж. БАУСТ

Институт Биомедицинской Технологии, Университет, штат Нью-Йорк, Бингхэмтон, США

Cryoablation: Apoptotic Phase Shifting and Cryo-Sensitization

J.G. BAUST

Institute of Biomedical Technology, State University of New York, Binghamton, NY, USA

Расширение применения термотерапии требует четкого понимания механизмов, с помощью которых низкие температуры разрушают ткани-мишени, тем самым давая еще один шанс на жизнь при лечении раковых поражений.

Расшифровка биохимических ответных реакций клеток на воздействие низких температур имеет важнейшее значение для постоянного улучшения эффективности лечения. С этой целью изучение «отложенного» начала гибели клеток позволило управлять клеточными реакциями посредством регуляции апоптотических путей. Мы предположили, что кроме явлений «отложенного» апоптоза, происходящих, как показано, в результате воздействия температур несколько ниже точки замерзания (10 до -25°C), в клетках, подвергшихся воздействию сверхнизких температур ($< -30^{\circ}\text{C}$), может наблюдаться даже более быстрое наступление апоптоза.

Клетки рака предстательной железы человека были подвергнуты воздействию температур от -60 , -30 , и -15°C для моделирования процедуры криоабляции. Используя проточную цитометрию, флуоресцентную микроскопию и анализ western blot, образцы были детально исследованы в разное время после оттаивания для определения стрессорных путей, вовлеченных в гибель клетки. Результаты показывают, что при сверхнизких температурах (ниже -30°C) значительная часть клеток подверглась запрограммированной смерти в течение всего лишь 30 мин после оттаивания, достигая максимума $\sim 40\%$ через 90 мин, а через 6 ч после размораживания наблюдались только некротические клетки. Однако при более высоких температурах ниже точки замерзания (выше -30°C), активация и прогрессирование апоптоза происходят более замедленно и не отмечаются до 6–24 ч после оттаивания. Уровни апоптоза были также значительно ниже: $\sim 10\%$ клеток, подвергающихся апоптозу, к 6 ч после оттаивания в результате воздействия температуры -15°C и до $\sim 25\%$ к 6 ч после оттаивания клеток, охлажденных до -30°C . Кроме того, было установлено, что раннее начало апоптоза запускалось посредством мембраноопосредованного каспазависимого механизма (внешнего), в то время как «отложенный» апоптоз вовлекал как внешние, так и внутренние (митохондриальные) пути. Эти данные свидетельствуют о влиянии апоптотического континуума, через который более сильный криогенный стресс активирует внешние, мембрано регулируемые апоптотические пути, в то время как менее «жесткое» замораживание активирует внутренние, митохондриально-опосредованные пути. Быстрая индукция и развитие апоптоза при сверхнизких температурах объясняют, почему ранее не были получены такие результаты после замораживания как в условиях криоабляции, так и криоконсервирования. В конечном счете наша цель – расшифровать события и сигнальные пути, которые специфически вовлечены в запуск быстрого наступления апоптоза. Как только это станет известно, криохирургические процедуры могут быть модифицированы таким образом, чтобы можно было выборочно индуцировать быстрое наступление апоптоза или задерживать гибель клеток для повышения общей эффективности криоабляции. Будут представлены первые доказательства того, что выбор криосенсибилизаторов позволяет повысить криочувствительность.

The expanding application of thermal therapies necessitates a clear understanding of the mechanisms by which low temperature destroys targeted tissue thereby yielding a viable option in the treatment of cancerous lesions. Critical to the continual improvement of treatment efficacy is deciphering the biochemical responses of cells to low temperature exposure. To that end, the identification of delayed onset cell death has allowed for the manipulation of cellular responses through the regulation of apoptotic pathways. We have hypothesized that in addition to delayed apoptotic events that have been shown to occur following exposure to mild sub-freezing temperatures (10 to -25°C), cells exposed to ultra-low temperatures ($< -30^{\circ}\text{C}$) may also undergo a more rapid, early onset apoptosis.

Human prostate cancer cells (PC3) were exposed to temperatures of -60 , -30 , and -15°C to simulate a cryoablative procedure. By utilizing flow cytometry, fluorescent microscopy, and western blot analyses, samples were interrogated at various times post-thaw to identify the stress pathways involved in cell death. The results indicate that at ultra low temperatures (below -30°C) a significant population of cells underwent programmed cell death within as little as 30 min of thawing, attaining a maximum of $\sim 40\%$ at 90 min, and by 6 hr post-thaw only necrotic cells were observed. At elevated sub-freezing temperatures (above -30°C), however, the activation and progression of apoptosis occurred in a more delayed manner and was not noted until 6–24 hr post-thaw. The levels of apoptosis were also significantly lower with $\sim 10\%$ of cells undergoing apoptosis at 6 hr post-thaw following exposure -15°C and $\sim 25\%$ at 6 hr post-thaw for cells frozen to -30°C . Additionally, it was found that early onset apoptosis progressed through a membrane mediated caspases-dependent mechanism (extrinsic) while delayed apoptosis involved both extrinsic and intrinsic (mitochondrial) pathways.

These data demonstrate the impact of apoptotic continuum whereby the more severe the cryogenic stress activates the extrinsic, membrane regulated apoptotic pathway while less severe freezing activates the intrinsic, mitochondrial mediated path. The rapid induction and progression of apoptosis at ultra low temperatures provides an explanation as to why such results have not previously been identified following freezing both in cryoablative or cryopreservation settings. Ultimately, it is our aim to decipher the events and signaling pathways that are specifically involved in triggering rapid-onset apoptosis. Once known, cryosurgical procedures might be modified such that rapid-onset and delayed programmed cell death pathways can be selectively induced, in an effort to improve the overall efficacy of cryoablation. Early evidence suggesting that select cryo-sensitizers offer the potential to improve freeze sensitivity will be presented.