

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені О. О. БОГОМОЛЬЦЯ**

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ ХІРУРГІЇ
ТА ТРАНСПЛАНТОЛОГІЇ імені О. О. ШАЛІМОВА»**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ХОМЕНКО ДМИТРО ІВАНОВИЧ

УДК: 616.37–089–085.832

ДИСЕРТАЦІЯ

**ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДУ КРІОФІКСАЦІЇ ПРИ ХІРУРГІЧНОМУ
ЛІКУВАННІ ПАЦІЄНТІВ З НЕЗАПАЛЬНИМИ ЗАХВОРЮВАННЯМИ
ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ**

14.01.03 «Хірургія»
(медичні науки)

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата наук

Дисертація містить результати власних досліджень.
Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на
відповідне джерело Д. І. Хоменко

Науковий керівник:
Дронов Олексій Іванович,
доктор медичних наук, професор

Київ – 2019

АНОТАЦІЯ

Хоменко Д. І. Оптимізація методу кріофіксації при хірургічному лікуванні пацієнтів з незапальними захворюваннями підшлункової залози. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.03 «Хірургія». – Національний медичний університет імені О. О. Богомольця МОЗ України, ДУ «Національний інститут хірургії та трансплантології імені О. О. Шалімова» НАМН України, Київ, 2019.

У дисертаційній роботі представлено результати експериментально-клінічного дослідження, в процесі проведення якого було вирішено ряд нових наукових завдань, що дозволило досягти поставленої мети – достовірно покращити віддалені результати хірургічного лікування хворих з незапальними захворюваннями підшлункової залози (НЗПЗ) шляхом удосконалення методу кріофіксації.

З метою проведення експериментальної та клінічної частини дослідження нами було розроблено спосіб контролю показників температури на дискретних глибинах в біологічній тканині у фіксованих точках шляхом застосування мідь-константанових термопар Т-типу довжиною (3, 8, 13 та 18 мм) від робочої поверхні кріоаплікатора з набору універсальної кріохірургічної установки «Кріо-Пульс» (Україна) під час процесу локальної кріодії в експерименті, та – кріофіксації в клініці (патент України на корисну модель № 116730.).

Метою експериментального дослідження була розробка ефективного методу потенціювання локальної кріодії на солідну злоякісну пухлину. Дослідження виконувались в лабораторії механізмів медикаментозної резистентності Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України (м. Київ) у чотири етапи.

Завданням першого етапу було визначення об'єму льодяної кулі (*ice-ball*) у гіпотонічному (дистильована H_2O), фізіологічному (0,9 % NaCl) та насиченому гіпертонічному (36 % NaCl) розчині під час локальної кріодії.

За результатами першого етапу дослідження встановлено: при локальній кріодії кріоаплікатором \varnothing 20 мм з часом експозиції періоду заморожування 10 хв, найбільший об'єм льоду утворюється в дистильованій H_2O і складає в середньому $(21,8 \pm 0,9)$ cm^3 , що на 71,6 % перевищує об'єм сегмента льодяної кулі в розчині 0,9 % NaCl та на 384,4 % – в розчині 36 % NaCl, для яких об'єми льоду склали $(12,7 \pm 0,3)$ cm^3 та $(4,2 \pm 0,3)$ cm^3 відповідно.

За результатами другого етапу експериментального дослідження на моделі клітин карциноми Герена було встановлено: час експозиції тривалістю 5 хв є достатнім при контакті пухлинних клітин (ПК) карциноми Герена з дистильованою H_2O для розвитку максимальної їх гідратації за рахунок осмосу; середня площа поперечного січення ПК препаратів групи порівняння складала $(17,3 \pm 0,1)$ μm^2 , що достовірно менше, ніж в дослідній групі препаратів $(59,7 \pm 0,5)$ μm^2 з часом експозиції в дистильованій H_2O – 5 хв на рівні значущості $p < 0,05$; середній розмір клітин карциноми Герена, що перебували в контакті з дистильованою H_2O , починаючи з 5-ї хвилини експозиції збільшується не менш ніж у 3,4 рази порівняно з групою порівняння; в 100 % клітин карциноми Герена, починаючи з 5-ї хв їх контакту з дистильованою H_2O , відмічались необоротні морфологічні зміни з різним ступенем деструкції, що вели до неминучої клітинної загибелі. Зі збільшенням часу експозиції контакту ПК з дистильованою H_2O до 10 та 15 хв дані деструктивні зміни продовжували лише прогресувати.

Метою третього етапу експериментального дослідження було отримання відповіді на запитання, чи посилює процес локальної кріодії попереднє введення дистильованої H_2O в біологічну тканину за відсутності кровотоку (модель *in vitro*). В якості експериментальної моделі було обрано паренхіматозний орган – печінку свині. Було сформовано дві групи дослідних зразків печінки: порівняння (ГП) та основну (ОГ). Локальну кріодію без додаткових маніпуляцій проводили в ГП; в ОГ – попередньо вводили 20 мл дистильованої H_2O в паренхіму печінки, в ділянці

запланованої локальної кріодії, через 5 хв після введення проводили локальний кріовплив. Щодо вихідного значення температури печінки свині, яка становила в обох групах 37 °С було встановлено, що в ОГ на глибині 3 мм від робочої поверхні кріоаплікатора в кінці 10-ї хв другого циклу кріовпливу середня температура на 97,2 % нижча, ніж в ГП; на глибині 8 мм – на 142,1 % нижча, ніж в ГП; на глибині 13 мм – на 152,7 % нижча ніж в ГП; на глибині 18 мм – на 109 % нижча ніж в ГП.

Таким чином, було встановлено, що в ОГ, де за 5 хв до початку локального кріовпливу в паренхіму печінки свині вводили дистильовану H₂O, в кінці 10-ї хв як першого, так і другого циклів кріовпливу на всіх глибинах (3, 8, 13 та 18 мм) отримано достовірно нижчі середні значення температур, ніж в ГП (дистильовану H₂O не вводили) на рівні значущості у всіх випадках $p < 0,001$.

Метою четвертого етапу експериментального дослідження було отримання відповіді на запитання, чи посилює попереднє введення дистильованої H₂O в солідну пухлину процес локальної кріодії за збереженого кровотоку.

В якості експериментальної моделі було обрано карциному Герена, перещеплену 40 білим безпородним щурам.

Застосовували кріоаплікатор діаметром 20 мм та температурою робочої поверхні –180 °С, час експозиції кріодії складав 5 хв. Кріодеструкцію виконували подвійним циклом з наступним спонтанним відтаванням після завершення 5-ї хв кріодії кожного циклу заморозки як у поєднанні з кріопотенціюванням дистильованою H₂O, так і без.

За показниками термопари Т3 (13 мм) та Т4 (18 мм) було відмічено, що середня температура з 1-ї та до 5-ї хв включно впродовж періоду заморозки першого циклу локальної кріодії не досягає мінусових значень на відміну від відповідних термограм, де застосовувалось кріопотенціювання дистильованою H₂O. При порівнянні значень середньої температури в пухлині карциноми Герена на дискретних глибинах (3, 8, 13 та 18 мм) за

показниками термометрів T1–T4 під час локальної кріодії, починаючи з 1-ї та до 5-ї хв включно, досягались достовірно нижчі показники температур в підгрупі С (n=10) як під час першого, так і другого періоду заморожування порівняно з підгрупою В (n=8) на рівні значущості $p < 0,001$.

Т.ч., вперше в експерименті, на моделях *in vitro* та *in vivo*, було обґрунтовано ефективність застосування попереднього введення в біологічну тканину дистильованої H₂O з метою потенціювання локальної кріодії.

В основу клінічної частини дослідження було покладено аналіз результатів діагностики, лікування та спостереження за 97 хворими з НЗПЗ, які були проліковані в період з 2010 до 2017 р. в Київському міському центрі хірургії захворювань печінки, жовчних протоків та підшлункової залози імені В. С. Земскова при Київській міській клінічній лікарні №10, що є клінічною базою кафедри загальної хірургії №1 НМУ імені О. О. Богомольця.

Дослідження було розподілено на 3 етапи: на **1-му етапі** (ретроспективний аналіз) (2010–2015 рр.) хворим з резектабельною солідною пухлиною ПЗ виконували класичний варіант резекції залози, тип якої залежав від локалізації пухлини; на **2-му етапі** (2015–2016 рр.) – проводили кріофіксацію пухлини з наступним виконанням резекції ПЗ, тип якої визначався локалізацією пухлини; на **3-му етапі** (2016–2017 рр.) проводили посилення процесу кріофіксації, шляхом попереднього введення в пухлину дистильованої H₂O з наступним виконанням кріофіксації та резекції ПЗ.

Усіх хворих, включених в дослідження в період з 2010 по 2017 рр., було розподілено на 3 групи – дві групи порівняння та одну основну.

Сформовані групи хворих були позначені наступним чином: «Р» – група порівняння хворих першого періоду дослідження (2010–2015 рр.), яким виконувався той чи інший тип резекції ПЗ за стандартною, загальноприйнятою на той момент часу методикою (n=46); «К+Р» – група порівняння хворих другого періоду дослідження (2015–2016 рр.), яким виконували кріофіксацію пухлини за загальноприйнятою на той момент часу методикою з наступним виконанням резекції ПЗ, тип якої визначався

локалізацією пухлини (n=21); «Д+К+Р» – основна група хворих третього періоду дослідження (2016–2017 рр.), яким спочатку проводили посилення процесу кріофіксації, шляхом попереднього введення в пухлину дистильованої H₂O з послідуочим виконанням кріофіксації та резекції ПЗ (n=30).

Групу порівняння (Р) та (К+Р) і основну групу (Д+К+Р) в свою чергу було розподілено на дві підгрупи: підгрупа I (хворі з локалізацією пухлини в проксимальному відділі ПЗ) та підгрупа II (хворі з локалізацією пухлини в дистальному відділі ПЗ).

На першому етапі клінічної частини дослідження в групі порівняння (Р) було встановлено, що середній V_{п.} за даними магнітно-резонансної панкреатохолангіографії (МРПХГ) складав (22,4 ± 2,9) см³ (95 % ВІ: 16,2–28,5 см³); V_{п.} за даними мультиспіральної комп'ютерної томографії (МСКТ) – (21,2 ± 2,8) см³ (95 % ВІ: 15,1–27,3); фактичний об'єм видаленої пухлини – (21,8 ± 2,3) см³ (95 % ВІ: 16,9–26,7). Т.ч. V_{п.} за даних МРПХГ та МСКТ достовірно не відрізняється від фактичного об'єму видаленої пухлини на рівні значущості, p=0,951.

Т.ч. за результатами першого етапу клінічної частини дослідження в групі порівняння (Р) було встановлено, що для розрахунку V_{п.} метод КТ немає переваг над МРПХГ. Отже, на доопераційному етапі у хворих з резектабельним РПЗ, яким планується кріофіксація пухлини з потенціюванням дистильованою H₂O однаково ефективно можуть бути застосовані для розрахунку V_{п.}, як КТ, так і МРПХГ методи.

У 2015 р. було проведено 2-й етап клінічного дослідження. Метод попередньої кріофіксації резектабельної солідної злоякісної пухлини при хірургічному лікуванні НЗПЗ був застосований у 21 хворого, які увійшли в групу порівняння (К+Р). Пацієнтам групи порівняння (К+Р) спочатку проводили кріофіксацію пухлини з наступним виконанням резекції ПЗ за стандартною методикою.

За результатами другого етапу клінічної частини дослідження було сформульовано наступні висновки: у хворих з локалізацією резектабельної солідної пухлини в тілі і хвості ПЗ при кріофіксації досягаються статистично значущо більш низькі середні температури на глибині 3, 8, 13 і 18 мм порівняно з хворими, у яких пухлина локалізується в головці ПЗ, що обумовлено масивним теплоприведенням від магістральних судин у проекції головки залози; кріофіксація резектабельної солідної пухлини ПЗ подвійним циклом кріоаплікатором діаметром 30 мм з тривалістю експозиції періоду заморозки 10 хв зі спонтанним відтаванням не гарантує 100 % необоротної деструкції ПК за рахунок первинного кріоушкодження на глибині 3, 8, 13 та 18 мм від робочої поверхні кріоаплікатора.

У 2016–2017 рр. було проведено 3-й етап клінічної частини дослідження. В основну групу (Д+К+Р) було включено 30 хворих з резектабельними НЗПЗ, в солідну резектабельну пухлину яких за 5 хв до початку проведення кріофіксації подвійним циклом вводили дистильовану H_2O з метою кріопотенціювання з наступним виконанням класичного варіанта резекції ПЗ залежно від локалізації пухлини в проксимальному чи дистальному її відділах (патент України на корисну модель № 119932 від 2017 р.).

Впроваджений спосіб кріопотенціювання шляхом попереднього введення в резектабельну злякисну солідну пухлину головки ПЗ дистильованої H_2O дозволив нам досягати під час кріофіксації температур в діапазоні мінусових значень, що у відсотковому співвідношенні на $(111,4 \pm 20,1) \%$ були нижчі в підгрупі $(Д+К+Р)_I$ порівняно з підгрупою $(К+Р)_I$. При цьому значення $t_{сер.}$ в підгрупі $(Д+К+Р)_I$ основної групи достовірно нижчі порівняно з підгрупою $(К+Р)_I$ групи порівняння на рівні значущості $p < 0,05$ по всіх дослідних глибинах (3, 8, 13, 18 мм).

Введення дистильованої H_2O в резектабельну злякисну солідну пухлину головки ПЗ за 5 хв до початку локальної кріодії (підгрупа $Д+К+Р_I$) дозволяє в кінці 10-ї хв другого циклу кріофіксації досягати температури

в діапазоні мінусових значень, що в середньому в $(2,1 \pm 0,2)$ рази перевищує значення температур, де кріопотенціювання не застосовували (підгрупа $K+P_I$).

Було встановлено, що попереднє введення дистильованої H_2O в резектабельну злоякісну солідну пухлину дистального відділу ПЗ дозволяє досягати під час кріофіксації температур у діапазоні мінусових значень також на всіх дослідних глибинах (3, 8, 13, 18 мм), що у відсотковому співвідношенні на $(91,1 \pm 22,3)$ % нижчі в підгрупі $(D+K+P)_{II}$ порівняно з підгрупою $(K+P)_{II}$. При цьому значення $t_{сер.}$ в підгрупі $(D+K+P)_{II}$ основної групи достовірно нижчі порівняно з підгрупою $(K+P)_I$ групи порівняння на рівні значущості $p < 0,05$ по всіх дослідних глибинах (3, 8, 13, 18 мм).

Введення дистильованої H_2O в резектабельну злоякісну солідну пухлину дистального відділу ПЗ за 5 хв до початку локальної кріодії (підгрупа $(D+K+P)_{II}$) дозволяє вкінці 10-ї хв другого циклу кріофіксації досягати температур в діапазоні мінусових значень, що в середньому в $(1,85 \pm 0,24)$ рази перевищує значення температур, де кріопотенціювання не застосовувалось (підгрупа $K+P_{II}$).

За результатами третього етапу клінічної частини дослідження було сформульовано висновок: кріофіксація резектабельної солідної злоякісної пухлини ПЗ, потенційована попереднім введенням в неї дистильованої H_2O , із застосуванням кріоаплікатора \varnothing 30 мм та проведенням подвійного циклу заморозки з часом експозиції одного циклу 10 хв та наступним спонтанним відтаванням після кожного циклу, дозволяє гарантовано отримувати необоротні деструктивні зміни у 100 % пухлинних клітин унаслідок ефекту первинного кріоушкодження, а також мікротромбозів у судинах мікроциркуляторного русла пухлини у всіх ділянках її об'єму.

Ефективність розробленого способу потенціювання кріофіксації резектабельної солідної пухлини ПЗ оцінювали шляхом порівняльного аналізу безпосередніх та віддалених результатів лікування між групами порівняння (P), $(K+P)$ та основною групою $(D+K+P)$.

Безпосередні ранні післяопераційні результати лікування оцінювали за наступними показниками: тривалість оперативного втручання (хв); об'єм інтраопераційної крововтрати (мл); чи проводилась гемотрансфузія під час операції та її об'єм; тривалість перебування хворого в реанімації після операції (доба); доба, на яку з'явилась активна перистальтика; частота та характер післяопераційних ускладнень; частота та причини релапаротомії (повторне оперативне втручання протягом 30 днів після первинної операції); кількість післяопераційних ліжко-днів; післяопераційна летальність.

Достовірної різниці між групами за вище наведеними показниками виявлено не було, окрім дня появи активної перистальтики, що з'являлась на 1-у добу пізніше в групі порівняння (К+Р) та основній групі (Д+К+Р) порівняно з групою порівняння (Р) і складала ($4 \pm 0,3$), ($4 \pm 0,25$) та ($3 \pm 0,2$) відповідно на рівні значущості $p < 0,001$.

Враховуючи те, що загалом по всій вибірці хворих на НЗПЗ ($n=97$), що були включені в дослідження в період з 2010 по 2017 рр. показник післяопераційної летальності склав 7,2 %, то віддалені результати лікування було відстежено в 90 з 97 хворих.

В термін спостереження 18 міс. кумулятивна виживаність в групі порівняння (Р) склала 42,2 %, групі порівняння (К+Р) – 49,5 %, основній групі (Д+К+Р) – 74,7 %. В основній групі (Д+К+Р) ймовірність виживаності хворих в термін спостереження 18 міс. достовірно на 32,5 % перевищував відповідний показник в групі порівняння (Р) та на 25,2 % – в групі порівняння (К+Р) на рівні значущості ($\chi^2=7,35$; $p=0,025$).

При проведенні порівняння по показнику кумулятивної виживаності в термін спостереження 1,5 роки між групами (Р) та (К+Р) достовірної різниці виявлено не було ($\chi^2=0,20$; $p=0,65$). При цьому кумулятивна виживаність в групі (К+Р) лише на 7,3 % перевищувала відповідний показник в групі (Р).

Оптимізація методу кріофіксації, шляхом розробки та впровадження в клінічну практику способу кріопотенціювання, що полягає в попередньому

введенні в солідну злоякісну резектабельну пухлину ПЗ дистильованої Н₂О за 5 хв до початку локальної кріодії кріоаплікатором Ø 30 мм з набору універсальної кріохірургічної установки «Кріо-Пульс» подвійним циклом зі спонтанним періодом відтавання після 10 хв кожного періоду заморозки дозволив достовірно збільшити кумулятивну виживаність хворих на НЗПЗ в основній групі (Д+К+Р) в термін спостереження 18 міс., що перевищував відповідний показник в групі порівняння (Р) на 32,5 % та на 25,2 % – в групі порівняння (К+Р) на рівні значущості ($\chi^2=7,35$; $p=0,025$).

Ключові слова: незапальні захворювання підшлункової залози, рак підшлункової залози, кріофіксація пухлини, пухлинні клітини, термопара, протокова аденокарцинома підшлункової залози, кріоаплікатор, кріопотенціювання, дистильована вода.

Khomenko D. I. Optimization of cryofixation method during the surgical treatment of patients with non-inflammatory diseases of the pancreas. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for a PhD degree in medical sciences in specialty 14.01.03 «Surgery». – O. O. Bohomolets National Medical University, State Institution «O. O. Shalimov National Institute of Surgery and Transplantology» National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.

The dissertation presents the results of experimental and clinical research, in the course of which a number of new scientific problems were solved, which allowed to achieve the set goal – to significantly improve the long-term results of surgical treatment of patients with non-inflammatory diseases of the pancreas (NIDP) by improving the method of cryoaction.

In order to carry out the experimental and clinical part of the study, we developed for the first time an approach to using the copper-constantan T-type thermocouples, for controlling temperature indices at discrete depths (3, 8, 13 and 18 mm) from the working surface of the cryoapplicator within a set of universal cryosurgical device «Cryo-Pulse» (Ukraine) in biological tissue at fixed points

during the local cryoaction during the experiment, and – cryofixation in the clinic (Ukrainian patent for utility model No. 116730.).

The purpose of the experimental study was the development of an effective method of potentiating local cryosurgery for a solid malignant tumor. The research was carried out in the Laboratory of Mechanisms of Medical Resistance at the Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology named after R. E. Kavetsky of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kyiv) in four phases.

The task of the first stage was to determine ice-ball volume in hypotonic (distilled H₂O), physiological (0,9 % NaCl) and saturated hypertonic (36 % NaCl) solution during local cryosurgery.

According to the results of the first phase of the study, it has been established: local cryoaction with a cryoapplicator Ø 20 mm with the 10 minutes exposure time of the freezing period, the largest volume of ice is formed in distilled H₂O and it's volume $(21,8 \pm 0,9) \text{ cm}^3$, that is 71,6 % bigger than the volume of the ice ball segment in a solution of 0,9 % NaCl and 384,4 % in a solution of 36 % NaCl, for which the volumes of ice were $(12,7 \pm 0,3) \text{ cm}^3$ and $(4,2 \pm 0,3) \text{ cm}^3$, respectively.

According to the results of the second phase of the experimental study on Guerin's carcinoma cell models: 5 min exposure time was sufficient for developing maximum hydration in Guerin's carcinoma tumor cells (TCs) which were contacting with distilled H₂O by osmosis process; the average cross-sectional area of the TCs of the comparison group was $(17,3 \pm 0,1) \mu\text{m}^2$, which is significantly less than in the experimental group of drugs $(59,7 \pm 0,5) \mu\text{m}^2$ with exposure time in distilled H₂O – 5 min at the level significance $p < 0,05$; the average size of Guerin's carcinoma cells which were in contact with distilled H₂O, starting from the 5-min exposure, increases in 3.4 times compared with the comparison group; in the 100% of Guerin's carcinoma cells, from the 5th min of their contact with distilled H₂O, irreversible morphological changes with varying degrees of degradation were observed and leading to inevitable cell death. With the increased exposure time of the TCs by distilled H₂O to 10 and 15 minutes, these destructive changes continued

to only progress.

The aim of the third phase of the experimental study was to receive the answer to the question if injection of distilled H₂O into a biological tissue in the absence of blood flow (in vitro model) leads to the local cryoaction process enhancing. As an experimental model a parenchymatous organ was chosen – the pig's liver. Two groups of experimental liver samples were formed: comparison group (CG) and basic group (BG). Local cryoaction without additional manipulation was performed in the CG; in BG – 20 ml of distilled H₂O were injected into the liver's parenchyma in the area of the planned local cryoaction and 5 minutes after administration, local cryoaction was performed.

Regarding the initial degree of pig liver temperature, which was in both groups of 37°C, it was found that in the BG at a depth of 3 mm from the working surface of the cryoapplicator at the end of the 10th minute of the second cycle of cryoaction, the average temperature was 97,2 % lower than in the CG; at a depth of 8 mm – by 142,1 % lower than in the CG; at a depth of 13 mm - by 152,7 % lower than in the CG; at a depth of 18 mm – 109 % lower than in the CG.

Thus, it was found that in BG, 5 min before the beginning of local cryoaction, where distilled H₂O was injected in the pig's liver parenchyma, at the end of the 10th min in both of the first and second cycles of cryoaction at all depths (3, 8, 13 and 18 mm), we received significantly lower average degree of the temperatures than were obtained in the CG (distilled H₂O was not injected) at the level of significance in all cases $p < 0,001$.

The aim of the fourth phase of the experimental study was to receive the answer to the question if injection of distilled H₂O into a solid tumor increases the process of local cryoaction for the preserved blood flow.

As an experimental model Guerin's carcinoma which transplanted into 40 white rats was chosen. The cryoapplicator was used with a diameter of 20 mm and a working surface temperature of -180 °C, the time of exposure to the cryoaction was 5 min. Cryodestruction was performed by double cycle followed with spontaneous thawing after the 5th min of the cryoaction of each freezing cycle, in

combination with cryopotentialization of distilled H₂O, and without it.

According to the T3 (13 mm) and T4 (18 mm) thermocouples, it was noted that the average temperature from the 1st and 5th minutes inclusive during the freezing period of the first cycle of local cryoaction did not reach the minus values, in contrast to the corresponding thermograms, where cryopotentialization with distilled H₂O was used. When comparing the mean temperature values in the Guerin carcinoma tumor at discrete depths (3, 8, 13 and 18 mm) according to the thermocouples T1-T4 during a local cryoaction, starting from 1st and 5th min inclusive, were achieved the values of temperatures in the subgroup C (n = 10) are significantly lower than in the first and second freezing periods compared with the subgroup B (n = 8) at the significance level $p < 0,001$.

Thus, for the first time in the experiment, on the models *in vitro* and *in vivo*, the effectiveness of the injections of distilled H₂O into the biological tissue was substantiated in order to potentiate the local cryoaction:

The basis of the clinical part of the study was the analysis of the results of diagnosis, treatment and follow-up of 97 patients with NIPDs that were treated in the period from 2010 to 2017 in the Kiev city center of surgery for liver, bile duct and pancreas named after V.S. Zemskov at Kyiv City Clinical Hospital № 10, which is the clinical base of the Department of General Surgery № 1 of the O. O. Bohomolets NMU.

The study was divided into 3 stages: at **stage 1** (retrospective analysis) (2010–2015), patients with resectable solid tumor had a classic version of the resection of the gland, the type of which depended on the localization of the tumor; at the **2nd stage** (2015–2016) – cryofixation of the tumor followed by resection of the pancreas, the type of which was determined by the localization of the tumor; at the **3rd stage** (2016–2017), the intensification of the cryofixation process was performed by preliminary injection into the tumor of distilled H₂O followed by cryofixation and resection of the pancreas.

All patients included in the study between 2010 and 2017 were divided into 3 groups – two groups of comparison and one main group.

For ease of perception of the presented data, the formed groups of patients were marked as follows: «R» – is a comparison group of patients of the first study period (2010–2015 years), which underwent one or another type of resection of the pancreas according to the standard, generally accepted at that time method (n = 46); «C + R» – is a comparison group of patients of the second study period (2015-2016) who underwent cryofixation of the tumor according to the generally accepted method at that time, followed by resection of the pancreas, the type of which was determined by the localization of the tumor (n = 21); «D + C + R» – the main group of patients in the third study period (2016-2017), which initially intensified the process of cryofixation, by preliminary injection of distilled H₂O into the tumor, followed by cryofixation and resection of the pancreas (n = 30).

In turn, the comparison group (R) and (C + R) and the main group (D+C+R) were divided into two subgroups: subgroup I (patients with localization of the tumor in the proximal part of pancreatic gland) and subgroup II (patients with localization of the tumor in the distal part of the pancreatic gland).

At the first stage of the clinical part of the study in the comparison group (R) it was found, that the mean Vt. according to the magnetic resonance pancreatic cholangiography (MRPCG) was $(22,4 \pm 2,9) \text{ cm}^3$ (95% VI: 16,2–28,5 cm^3); Vt according to multispiral computed tomography (MSCT) – $(21,2 \pm 2,8) \text{ cm}^3$ (95 % CI: 15,1–27,3); the actual volume of the removed tumor is $(21,8 \pm 2,3) \text{ cm}^3$ (95 % BI: 16,9–26,7). T.h. Vt according to the data of MRPCG and MSCT does not significantly differ from the actual volume of removed tumor at the level of significance, p = 0,951.

T.h. according to the results of the first stage of the clinical part of the study in the comparison group (R) it was found that the calculation of Vt. for CT method has no advantages over MRPC. Thus, at the preoperative stage in patients with resectable pancreatic cancer, which is planned to cryofixation of tumors with potentiation by distilled H₂O, can be equally effectively used to calculate Vt., with both CT, and MRPCG methods.

In 2015, the 2nd stage of the clinical trial was conducted. The method of

prior cryofixation of a resectable solid malignant tumor in the surgical treatment of NIPDs was applied to 21 patients who were included in the comparison group (C+R). In patients of the comparison group (C+R) who initially underwent cryofixation of the tumor, followed by resection of the pancreas according to the standard procedure.

According to the results of the second stage of the clinical part of the study, the following conclusions were formulated: in patients with localization of a resectable solid tumor in the body and tail of the pancreas during cryofixation statistically significant lower average temperatures at depths of 3, 8, 13 and 18 mm are achieved compared with patients in which the tumor is localized in the head of the pancreatic gland due to massive heat transfer from the main vessels in projection of the head of the gland; cryofixation of a resectable solid tumor with double cycle with a diameter of cryoapplicator of 30 mm with an exposure duration of 10 min freezing with spontaneous thawing does not guarantee 100 % irreversible destruction of the TCs due to the primary cryoaction at a depth of 3, 8, 13 and 18 mm from the working surface of the cryoapplicator.

In 2016–2017, the 3rd stage of the clinical part of the study was conducted. In the main group (D + C + R), 30 patients with resectable solid pancreatic tumor that was injected with distilled H₂O for cryopotentialization 5 minutes prior to the beginning of the cryofixation followed by the execution of the classical variant of resection of the pancreatic gland depending on the localization of the tumor in its proximal or distal parts (Ukrainian Patent for utility model No. 119932 from 2017).

The introduced method of cryopotentialization by the injections into the resectable malignant tumor of the head of the pancreatic gland with distilled H₂O probe allowed us to achieve temperature in the range of minus values within the process of cryofixation, which was lower for $(111,4 \pm 20,1)$ % in the subgroup (D + C + R)_I compared to the subgroup (C + R)_I. The value of average temperature in the subgroup (D + C + R)_I of the main group is significantly lower compared to the subgroup (C + R)_I of the group of the comparison at the significance level $p < 0,05$ at all the experimental depths (3, 8, 13, 18 mm).

The injection of distilled H₂O into a resectable malignant solid tumor of the head of the pancreatic gland for 5 min prior to the onset of a local cryoaction (subgroup D + C + R_I) allows at the end of the 10th min of the second cryofixation cycle to reach a temperature in the range of minus values, which is on average $(2,1 \pm 0,2)$ times exceeds the temperature values where cryopotentialization was not used (subgroup C + R_I).

It was found that the preliminary injection of distilled H₂O into a resectable malignant solid tumor of the distal section of the pancreatic gland allows to achieve, during the cryofixation temperatures in the range of minus values, at all experimental depths (3, 8, 13, 18 mm), which, in percentages on $(91,1 \pm 22,3)$ % lower in the subgroup (D + C + R)_{II} compared to the subgroup (C + R)_{II}. The average value of temperature in the subgroup (D + C + R)_{II} of the main group, is relatively lower in comparison with the subgroup (C + R)_I of comparison group at the level of significance $p < 0,05$ at all experimental depths (3, 8, 13, 18 mm).

The injection of distilled H₂O into a resectable malignant tumor of the distal part of the pancreatic gland for 5 min prior to the onset of the local cryoaction (subgroup (D + C + R)_{II}) allows to reach temperatures in the range of minus values the end of the 10th min of the second cryofixation cycle, which is on average in $(1,85 \pm 0,24)$ times exceeds the temperature values where cryopotentialization was not applied (subgroup C + R_{II}).

According to the results of the third stage of the clinical part of the study, the following conclusions were formulated: cryofixation of a resectable solid malignant tumor of the PG, potentiated by the preliminary injection of distilled H₂O into it, with the use of a cryoapplicator of Ø 30 mm and a double freezing cycle with the exposure time of one cycle of 10 minutes and the subsequent spontaneous thawing after each cycle, allows to obtain irreversible destructive changes in 100 % tumor cells due to the effect of primary cryodamage, as well as microthrombosis in the vessels of the microcirculatory system of tumor in all sections of its volume.

The effectiveness of the developed method for potentiating cryofixation of

resectable solid tumor of PG was assessed by comparing the analysis of direct and long-term treatment results between the comparison groups (R), (C + R) and the main group (D + C + R).

Immediate early postoperative treatment outcomes were evaluated according to the following indicators: duration of surgical intervention (min); volume of intraoperative blood loss (ml); whether hemotransfusion during the operation was performed and its volume; the length of stay of the patient in resuscitation after the operation (day); the day on which active peristalsis appeared; the frequency and nature of postoperative complications; the frequency and causes of relaparotomy (repeated surgical intervention within 30 days of the initial operation); number of postoperative bed-days; postoperative lethality.

There was no significant difference between the groups according to the above-mentioned indicators, except for the day of the appearance of active peristalsis, which appeared 1 day later in the comparison group (C + R) and the main group (D + C + R) compared with the comparison group (R) and was ($4 \pm 0,3$), ($4 \pm 0,25$) and ($3 \pm 0,2$) respectively, at the significance level of **$p < 0,001$** .

Taking into account that in the whole sample of patients with NIPDs ($n = 97$) that were included in the study between 2010 and 2017, the rate of postoperative lethality was 7,2 %, then the long-term results of treatment were monitored in 90 out of 97 patients.

In the period of observation 18 months. Cumulative survival in the comparison group (R) was 42,2 %, for the comparison group (C + R) – 49,5 %, for the main group (D + C + R) – 74,7%. In the main group (D + C + R) the probability of survival of patients in the observation period is 18 months. 32,5 % was 32,5 % more than the corresponding indicator in the comparison group (P) and 25,2 % in the comparison group (C + R) at the level of significance ($\chi^2 = 7,35$; $p = 0,025$).

At comparing the indicator of cumulative survival in the observation period 1.5 years, there was no significant difference between the groups (R) and (C + R) ($\chi^2 = 0,20$; $p = 0,65$). In this case, the cumulative survival in the group (C + R) was

only 7,3 % higher than the corresponding indicator in the group (R).

Optimization of the method of cryofixation by developing and introducing into the clinical practice a method of cryopotentialization consisting in preliminary introduction into a solid malignant resectable tumor of distilled H₂O software for 5 minutes prior to the onset of local cryotherapy with a cryopathic device Ø 30 mm from a set of a universal cryosurgical unit "Cryo-Pulse" with a double cycle with a spontaneous thawing period after 10 minutes of each period of freezing allowed to significantly increase cumulative survival in patients with NIPDs in the main group (D + C + R) during the observation period 18 month., which exceeded the corresponding figure in the comparison group (R) by 32,5 % and 25,2 % – in the comparison group (C + R) level of significance ($\chi^2 = 7,35$; $p = 0,025$).

Key words: non-inflammatory diseases of the pancreas, pancreatic cancer, cryofixation of tumors, tumor cells, thermocouples, ductal adenocarcinoma of the pancreas, cryoapplicator, cryopotentialization, distilled water.

Список публікацій здобувача:

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Дронов О. І., Хоменко Д. І., Козачук Є. С. Потенціювання локальної кріодії дистильованою Н₂О на моделі безпородних щурів з перевитою карциномою Герена за умов збереженого кровотоку (*in vivo*). Експериментальна і клінічна медицина. 2018. № 1(78). С. 9–19. *(Здобувачем проведено порівняльний аналіз термограм щурів з перевитою карциномою Герена, обґрунтовано потенціуючий ефект введення дистильованої води в солідну пухлину до початку кріодії, написано статтю).*

2. Дронов О. І., Земсков С. В., Хоменко Д. І. Власний досвід визначення ізольованих пухлинних клітин в перитонеальних змивах хворих на рак підшлункової залози. Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П. Л. Шупика. 2014. Вип. 23. Ч. 1. С. 192–197. *(Здобувачем організовано забезпечення виконання діагностики ізольованих пухлинних клітин в перитонеальних змивах хворих на рак підшлункової залози,*

безпосередня участь в операціях, написано статтю).

3. Дронов О. І., Крючина Є. А., **Хоменко Д. І.**, Горлач А. І., Любенко Д. І., Добуш Р. Д., Козачук Є. С. Профілактика дисемінації клітин злоякісних пухлин підшлункової залози. Хірургія України. 2013. № 1. С. 92–99. *(Здобувачем визначено актуальність розробки методів профілактики інтраопераційної дисемінації пухлинних клітин під час радикальних оперативних втручаннях у хворих на рак підшлункової залози, написано статтю).*

Статті у наукових фахових виданнях України,

включених до міжнародних наукометричних баз даних:

4. 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. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2017. № 27(4). С. 348–355. *(Здобувачем досліджено потенціуючі властивості дистильованої води під час локального кріовпливу на експериментальній моделі печінки свині за умов відсутності спланхнічного кровотоку, написано статтю).*

5. Дронов А. И., **Хоменко Д. И.**, Земсков С. В., Бакунец П. П., Козачук Е. С. Криофиксация резектабельной протоковой аденокарциномы поджелудочной железы. Хірургія України. 2017. № 4 (64). С. 27–34. *(Здобувачем запропоновано застосування нового методу контролю ефективності процесу кріофіксації резектабельної солідної пухлини підшлункової залози, написано статтю).*

Статті у наукових виданнях інших держав:

6. Дронов А.И., Ковальская И. А., **Хоменко Д. И.**, Жарков А. Я., Лещенко В.М., Крутько О.А., Козачук Е. С. Термометрия процесса локального криовоздействия в биологической ткани на дискретных глубинах: разработка комплекса измерительного интраоперационного термопарного

четырёх-канального (КИИТ-4). Хирургия. Восточная Европа. 2018. Т. 7. № 1. С. 102–110. *(Здобувачем запропоновано застосування розробленого вимірювального комплексу термопарного чотириканального для інтраопераційної реєстрації показників температури в біологічній тканині на дискретних глибинах, написано статтю).*

7. Дронов А. И., Земсков С. В., Бакунец П. П., Козачук Е. С., **Хоменко Д. И.** Криоабляционные технологии в комплексном лечении пациентов со злокачественной опухолью поджелудочной железы. Хирургия. Восточная Европа. 2017. Т. 6. № 3. С. 411–422. *(Здобувачем особисто написано фрагмент статті, що пов'язаний із застосуванням методу криофіксації при радикальному хірургічному лікуванні пацієнтів з незапальними захворюваннями підшлункової залози).*

8. Дронов А. И., Ковальская И. А., **Хоменко Д. И.**, Земсков С. В. Клиническое значение и собственный опыт выявления циркулирующей опухолевой дезоксирибонуклеиновой кислоты у пациентов с протоковой аденокарциномой поджелудочной железы. Хирургия. Восточная Европа. 2017. Т. 6. № 1. С. 36–42. *(Здобувачем проведено діагностику циркулюючої пухлинної ДНК у хворих на резектабельний рак підшлункової залози, написано статтю).*

9. Riva F., Dronov O. I., **Khomenko D. I.**, Huguet F., Louvet C., Mariani P., Stern M.-H., Lantz O., Proudhon C., Pierga J.-Y., Bidard F.-C. Clinical applications of circulating tumor DNA and circulating tumor cells in pancreatic cancer. Molecular Oncology. 2016. Vol. 10. № 3. P. 481–493. *(Здобувачем проведено глибокий аналіз сучасних діагностичних можливостей визначення циркулюючої пухлинної ДНК, циркулюючих пухлинних клітин у хворих на рак підшлункової залози, сформовано висновки).*

Патенти:

10. Дронов О. І., **Хоменко Д. І.**, Лещенко В. М., Жарков А. Я., Крутько О. А., Земсков С. В., Козачук Є. С. Патент на корисну модель

№116730 Україна, МПК А61В 18/02 А61В 17/32. Комплекс вимірювальний інтраопераційний терморпарний чотириканальний (КВІТ-4); власник Дронов О. І., Хоменко Д. І., Лещенко В. М., Жарков А. Я., Крутько О. А., Земсков С. В., Козачук Є. С. № у 201603076; заявлено 25.03.2016; опубліковано 12.06.2017; Бюл. 11. *(Здобувачем розроблено спосіб контролю показників температури на дискретних глибинах в біологічній тканині шляхом застосування мідь-константанових терморпар Т-типу для контролю ефективності, оформлено патент).*

11. Дронов О. І., **Хоменко Д. І.** Патент на корисну модель №119932, Україна, МПК А61В 17/00 А61В 18/02. Спосіб посилення процесу кріофіксації резектабельної злоякісної солідної пухлини підшлункової залози дистильованою Н₂О. власник Дронов О. І., Хоменко Д. І. № у 201705020; заявлено 24.05.2017; опубліковано 10.10.2017; Бюл. 19. *(Здобувачем запропоновано спосіб введення в біологічну тканину, в тому числі пухлинну, дистильованої води за 5 хв до початку локальної кріодії, обґрунтовано потенціуючі ефекти даного способу на клінічних прикладах, оформлено патент).*

Тези наукових доповідей:

12. **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 Н₂О. Інновації в медицині: досягнення молодих вчених: 40-а ювілейна науково-практична конференція молодих вчених Національної медичної академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупика з міжнародною участю, присвячена Дню науки, м. Київ, 18 травня 2017 року: тези доповіді. Київ, 2017. С. 91–93. *(Здобувачем проведено спериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).*

13. Dronov O. I., Kovalska I. O., **Khomenko D. I.**, Kozachuk Y. S., Vakunets P. P., Zemskov S. Cryofixation of Pancreas Resectable Malignant Solid

Tumors. 19th World Congress of International Society of Cryosurgery, Kaunas, Lithuania, September 13–15, 2017: abstract book. Kaunas, 2017. P. 26–28. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).*

14. **Khomenko D.**, Kosachuk E., Teterina V. Potentiation of local cryoablation process on biological tissue via distilled H₂O. 68th Congress of the Association of Polish Surgeons, Cracow, September 27–30, 2017: abstract book. Cracow, 2017. P. 504. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).*

15. Dronov O. I., Zemskov S. V., **Khomenko D. I.** Clinical significance of the isolated tumor cell detection in the peritoneal lavage solution in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. Integrated clinical and pathogenetic approaches in diagnosis and therapy of cancer: International scientific conference, Kyiv, June 13–15, 2016: materials. Experimental Oncology. – 2016. Vol. 38. №2. P. 131–132. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).*

16. Дронов А.И., Бакунец П. П., Земсков С.В., **Хоменко Д.И.**, Козачук Е. С. Метод криодеструкции в лечении больных с опухолью поджелудочной железы. Актуальные проблемы гепатопанкреатобилиарной хирургии: XXIV Международный Конгресс Ассоциации гепатопанкреатобилиарных хирургов стран СНГ, г. Санкт-Петербург, 19–22 сентября 2017 года: тезисы доклада. СПб., 2017. С. 158. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).*

17. **Хоменко Д. И.**, Лук'янова Н. Ю., Козачук Є. С. Результаты исследования процессу локальної кріодії на експериментальних моделях розчинів 36 % NaCl, дистильованої H₂O та 0,9 % NaCl та перспективи їх застосування при проведенні кріофіксації солідних пухлин підшлункової залози. Здобутки клінічної та експериментальної медицини: Підсумкова

науково-практична конференція, з'ячена 60-річчю Тернопільський державний медичний університет, м. Тернопіль, 14 червня 2017 р.: тези доповіді. Тернопіль, 2017. С. 182–184. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).*

ЗМІСТ

| | |
|--|----|
| ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ | 26 |
| ВСТУП..... | 28 |
| РОЗДІЛ 1. АНАЛІЗ СУЧАСНОГО СТАНУ ПРОБЛЕМИ ХІРУРГІЧНОГО ЛІКУВАННЯ ПАЦІЄНТІВ З НЕЗАПАЛЬНИМИ ЗАХВОРЮВАННЯМИ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ (огляд літератури) | 34 |
| 1.1. Методи абляції пухлин підшлункової залози..... | 37 |
| 1.2. Історія кріохірургії..... | 41 |
| 1.3. Кріофіксація пухлин підшлункової залози..... | 43 |
| 1.4. Механізми ефекту кріодеструкції пухлин..... | 46 |
| 1.5. Методи потенціювання локальної кріодії на біологічну тканину..... | 51 |
| РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ..... | 56 |
| 2.1. Дизайн клінічного дослідження..... | 56 |
| 2.2. Загальна характеристика хворих..... | 59 |
| 2.3. Методи обстеження хворих..... | 67 |
| 2.3.1. Обов'язкові методи діагностики хворих груп порівняння (Р), (К+Р) та основної групи (Д+К+Р)..... | 68 |
| 2.4. Методика термометрії процесу кріофіксації в біологічній тканині на дискретних глибинах..... | 73 |
| РОЗДІЛ 3. ПОТЕНЦІЮВАННЯ ВПЛИВУ НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР НА ПУХЛИННУ ТКАНИНУ (ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)..... | 77 |
| 3.1. Матеріали та методи експериментальних досліджень..... | 77 |
| 3.2. Результати дослідження процесу локальної кріодії на експериментальних моделях розчинів 0,9 % NaCl, 36 % NaCl та дистильованої H ₂ O..... | 83 |

| | |
|--|-----|
| 3.3. Залежність морфологічних змін у клітинах карциноми Герена від часу експозиції в дистильованій Н ₂ О | 92 |
| 3.4. Результати дослідження процесу локальної кріодії, потенційованого дистильованою Н ₂ О, на моделі печінки свині за відсутності спланхнічного кровотоку..... | 102 |
| 3.5. Результати дослідження процесу локальної кріодії, потенційованого дистильованою Н ₂ О, на моделі безпородних щурів з перещепленою карциномою Герена за збереженого кровотоку..... | 113 |
| РОЗДІЛ 4. ДІАГНОСТИКА ТА ХІРУРГІЧНЕ ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ З РЕЗЕКТАБЕЛЬНОЮ СОЛІДНОЮ ЗЛОЯКІСНОЮ ПУХЛИНОЮ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ В ГРУПІ ПОРІВНЯННЯ (Р)..... | 127 |
| РОЗДІЛ 5. КРІОФІКСАЦІЯ РЕЗЕКТАБЕЛЬНИХ СОЛІДНИХ ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ В ГРУПІ ПОРІВНЯННЯ (К+Р)..... | 144 |
| РОЗДІЛ 6. ПОТЕНЦІЮВАННЯ МЕТОДУ КРІОФІКСАЦІЇ ДИСТИЛЬОВАНОЮ Н ₂ О ПРИ ХІРУРГІЧНОМУ ЛІКУВАННІ ХВОРИХ З РЕЗЕКТАБЕЛЬНОЮ СОЛІДНОЮ ЗЛОЯКІСНОЮ ПУХЛИНОЮ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ В ОСНОВНІЙ ГРУПІ (Д+К+Р)..... | 158 |
| РОЗДІЛ 7. ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА КЛІНІЧНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ ХІРУРГІЧНОГО ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ З НЕЗАПАЛЬНИМИ ЗАХВОРЮВАННЯМИ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ МЕТОДУ КРІОФІКСАЦІЇ | 174 |
| 7.1. Порівняльний аналіз безпосередніх результатів хірургічного лікування хворих з резектабельною протоковою аденокарциномою підшлункової залози із застосуванням методу кріофіксації..... | 174 |

| | |
|--|-----|
| 7.2. Порівняльний аналіз віддалених результатів хірургічного лікування хворих з резектабельною протоковою аденокарциномою підшлункової залози між групами (Р), (К+Р) та (Д+К+Р)..... | 179 |
| АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ..... | 187 |
| ВИСНОВКИ..... | 205 |
| ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ..... | 207 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ..... | 208 |
| ДОДАТОК 1. Список опублікованих праць | 226 |
| ДОДАТОК 2. Впровадження | 231 |

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ,
СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ**

| | | |
|--------------|---|---|
| ANSI | – | Північноамериканський національний інститут стандартів |
| ASCO | – | Американське товариство клінічної онкології |
| CA 19-9 | – | вуглеводний антиген 19-9 |
| ESMO | – | Європейське товариство медичної онкології |
| KRAS-мутація | – | протоонкоген, представник групи білків Ras |
| NCCN | – | Національна загальна онкологічна мережа США |
| RAMPS | – | радикальна антеградна модульна панкреатоспленектомія |
| БВ | – | безрецидивна виживаність |
| ВІ | – | вірогідний інтервал |
| ГП | – | група порівняння |
| ДГ | – | дослідна група |
| ДНК | – | дезоксирибонуклеїнова кислота |
| ДПК | – | дванадцятипала кишка |
| ДР | – | дистальна резекція |
| ЕРХПГ | – | ендоскопічна ретроградна холангіопанкреатографія |
| ЕУС | – | ендоскопічна ультрасонографія |
| ЕФГДС | – | езофагогастродуоденоскопія |
| ЗВ | – | загальна виживаність |
| ЗЗ | – | зважене зображення |
| ІЕПОР | – | Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології |
| ІПК | – | ізолювані пухлинні клітини |
| ІФА | – | імуноферментний аналіз |
| ІЦХ | – | імуноцитохімічний |
| КВІТ-4 | – | комплекс вимірювальний інтраопераційний |

| | |
|---------|---|
| | термопарний чотириканальний |
| КТ | – комп'ютерна томографія |
| МІПЛ | – масивний інтраопераційний перитонеальний лаваж |
| МРІХГ | – магнітно-резонансна панкреатохолангіографія |
| МРТ | – магнітно-резонансна томографія |
| МСКТ | – мультиспіральна комп'ютерна томографія |
| НВЧ-ЕМП | – надвисокочастотне електромагнітне поле |
| НЗПЗ | – незапальні захворювання підшлункової залози |
| ОГ | – основна група |
| ОЧП | – органи черевної порожнини |
| ПАПЗ | – протокова аденокарцинома підшлункової залози |
| ПДР | – панкреатодуоденальна резекція |
| ПЗ | – підшлункова залоза |
| ПК | – пухлинні клітини |
| ПЛР | – полімеразна ланцюгова реакція |
| РЕА | – раково-ембріональний антиген |
| РПЗ | – рак підшлункової залози |
| УЗД | – ультразвукове дослідження |
| ФКС | – фіброколоноскопія |
| цпДНК | – циркулююча пухлинна дезоксирибонуклеїнова кислота |
| ЦПК | – циркулюючі пухлинні клітини |

ВСТУП

Актуальність теми. До групи незапальних захворювань підшлункової залози [46] відносять одне з найнебезпечніших – рак підшлункової залози, що являється четвертою серед найбільш поширених причин смертності від злоякісних новоутворень в світі [113].

Очікувана захворюваність на рак підшлункової залози за прогнозами [140] до 2030 року збільшиться на 55 %. За прогнозами Rahib L., в США до 2030 року рак підшлункової залози стане другою провідною причиною смертності від злоякісних новоутворень. Резектабельність злоякісних пухлин підшлункової залози складає за різними джерелами від 10 до 25 % [69, 113, 125].

Протягом останніх десятиліть навіть після радикального хірургічного лікування резектабельного раку підшлункової залози віддалені результати лікування залишаються вкрай невтішними [35, 47], так як показник 5-річної виживаності пацієнтів, яким все ж вдається виконати радикальне хірургічне втручання, перевищує 5–6 % лише у провідних спеціалізованих центрах [103, 137, 149]. Це пов'язано з тим, що у 65–85 % радикально оперованих хворих на рак підшлункової залози в перші 2 роки після оперативного лікування розвивається локальний рецидив або виявляються віддалені метастази, перитонеальна дисемінація [74, 94, 122, 155]. Однією з причин незадовільних віддалених результатів радикального хірургічного лікування хворих на рак підшлункової залози ряд авторів пов'язують з інтраопераційною дисемінацією пухлинних клітин внаслідок пальпаторно-тракційних маніпуляцій з пухлиною на етапі її мобілізації [20, 36, 104, 106, 120, 124, 132, 153, 160].

Актуальним є пошук методів та способів практичної реалізації запобігання дисемінації злоякісних пухлинних клітин під час виконання радикальних оперативних втручань на підшлунковій залозі [104, 106, 120, 124].

Поліпшити показники радикального хірургічного лікування хворих на рак підшлункової залози ряд вчених пов'язують із застосуванням кріохірургічних технологій [34, 39, 52], а саме – кріофіксацією пухлини

підшлункової залози [14]. Методу властиві абластичний та антибластичний ефекти. Абластичний ефект кріовпливу пов'язаний із здатністю низькотемпературної дії спричиняти тромбоз артерій до 2,5 мм та вен до 6 мм у діаметрі та некроз судин малого діаметру: артеріол, капілярів, тим самим виключаючи локальний пухлинний кровоток [7, 34]. Антибластичний ефект локальної кріодії пов'язаний з механізмами індукції деструкції пухлинних клітин [52].

Основним недоліком кріоаблації пухлин підшлункової залози є неповна деструкція клітин в пограничній зоні, де важко досягти температур в діапазоні мінусових значень [167].

Тому метод кріофіксації солідних резектабельних пухлин підшлункової залози потребує оптимізації шляхом розробки методу інтраопераційного контролю показників температури на дискретних глибинах в пухлині та ефективного способу кріопотенціювання.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана згідно з планом науково-дослідної роботи кафедри загальної хірургії №1 Національного медичного університету імені О. О. Богомольця МОЗ України «Застосування кріохірургічних технологій в комплексному лікуванні пухлин гепатопанкреатодуоденальної зони» (номер державної реєстрації 0116U004901; 2016–2018 рр.)

Мета та завдання дослідження. Мета дисертаційного дослідження – покращення результатів хірургічного лікування хворих з незапальними захворюваннями підшлункової залози шляхом удосконалення методу кріофіксації.

Для досягнення поставленої мети вирішували наступні завдання:

1. Розробити спосіб контролю показників температури на фіксованій глибині (3, 8, 13 та 18 мм) від робочої поверхні кріоаплікатора під час проведення кріофіксації резектабельної пухлини підшлункової залози та оцінити значення отриманих температур в залежності від локалізації пухлини відносно проксимального та дистального відділів залози.

2. Визначити морфологічні зміни фіксованих точок у пухлині, що піддавалась кріофіксації, та встановити кореляційний зв'язок між цими змінами та температурним градієнтом.

3. Визначити діагностичну значимість цитологічного, імуноцитохімічного методів в ідентифікації циркулюючих пухлинних клітин в крові та ізольованих пухлинних клітин у перитонеальних змивах і методу полімеразної ланцюгової реакції в ідентифікації циркулюючої пухлинної дезоксирибонуклеїнової кислоти у хворих на резектабельний рак підшлункової залози.

4. Удосконалити відомі та розробити нові методи потенціювання впливу низьких температур на пухлинну тканину в експерименті та клініці.

5. Оцінити результати застосування розробленого методу кріофіксації при хірургічному лікуванні пацієнтів з незапальними захворюваннями підшлункової залози.

Об'єкт дослідження – незапальні захворювання підшлункової залози, дистильована H_2O , 36 % $NaCl$, 0,9 % $NaCl$, перевита карцинома Герена білим безпородним щурам, печінка свині.

Предмет дослідження – метод кріодії на біологічну тканину.

Методи дослідження: клінічні, лабораторні, інструментальні, променеві, морфологічні, імунологічні, молекулярно-генетичні, фізичні спеціальні методи, статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Розроблено спосіб контролю показників температури на дискретних глибинах від робочої поверхні кріоаплікатора з набору універсальної кріохірургічної установки «Кріо-Пульс» в біологічній тканині у фіксованих точках під час процесу локальної кріодії в експерименті, та кріофіксації в клініці, шляхом застосування мідь-константанових термопар Т-типу довжиною 3, 8, 13 та 18 мм (патент на корисну модель України №116730, 2017 р.).

Вперше в експерименті, на моделях *in vitro* та *in vivo*, було обґрунтовано ефективність застосування попереднього введення в біологічну тканину

дистильованої H_2O з метою потенціювання локальної кріодії: встановлено достатню мінімальну тривалість часу експозиції, від моменту введення в біологічну тканину дистильованої H_2O , до початку процесу локальної кріодії, що склала 5 хв; розроблено формулу розрахунку об'єму дистильованої H_2O , що потрібно ввести в солідну пухлину з метою кріопотенціювання ($V_{д.в.} = V_{п.х} \cdot 0,38$); вперше методом цитоморфометричного аналізу встановлено, що через 5 хв після введення в пухлинну тканину дистильованої H_2O площа поперечного січення клітин збільшується не менше ніж в 3,4 рази за рахунок осмотичного набряку.

Вперше було встановлено значення масивного теплоприведення від магістральних судин в проекції задньої поверхні головки підшлункової залози, як чинника, що погіршує ефективність кріофіксації подвійним циклом резектабельних солідних злоякісних пухлин проксимального відділу.

Розроблено ефективну методику потенціювання процесу кріофіксації дистильованою H_2O резектабельних солідних злоякісних пухлин, при хірургічному лікуванні хворих з незапальними захворюваннями підшлункової залози (Патент на корисну модель України № 119932, 2017 р.), що дозволило отримати середні температури в діапазоні мінусових значень в кінці 10-ї хв другого циклу заморозки, які в $(2,1 \pm 0,2)$ рази перевищують значення температур, де кріопотенціювання не застосовували – при локалізації пухлини в проксимальному відділі підшлункової залози, та в $(1,85 \pm 0,24)$ рази – при локалізації пухлини в дистальному відділі підшлункової залози.

Практичне значення одержаних результатів. Оптимізація методу кріофіксації, шляхом розробки та впровадження в клінічну практику нового, ефективного способу кріопотенціювання, що полягає в попередньому введенні в солідну злоякісну резектабельну пухлину підшлункової залози дистильованої H_2O за 5 хв до початку локальної кріодії кріоаплікатором $\varnothing 30$ мм з набору універсальної кріохірургічної установки «Кріо-Пульс» подвійним циклом зі спонтанним періодом відтавання після кожного періоду заморозки дозволяє достовірно збільшити показник кумулятивної виживаності хворих в

термін спостереження 18 місяців до 74,7 %, що на 32,5 % перевищує відповідний показник в групі хворих, де виконувалась лише радикальна резекція підшлункової залози та на 25,2 % більше, де було застосовано кріофіксацію пухлини підшлункової залози з послідуною резекцією без потенціювання дистильованою H_2O на рівні значущості ($\chi^2 = 7,35$; $p = 0,025$).

Особистий внесок здобувача. Всі розділи дисертації написані автором самостійно. Дисертантом особисто виконано всі етапи експериментальної частини дослідження на базі Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України. Автор брав участь у проведенні 60 % оперативних втручань, включених в дослідження хворих. Проводив лікувально-діагностичний алгоритм у хворих, що залучались в дослідження проспективно. Дисертантом, на основі аналізу історій хвороб з архіву Київської міської клінічної лікарні № 10 в період з 2010 по 2017 рр., сформовано електронну базу даних 97 пацієнтів, включених в дослідження. За участю наукового керівника здійснено планування етапів дослідження, обговорення результатів та формулювання висновків.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації викладені та обговорені на International scientific conference «Integrated clinical and pathogenetic approaches in diagnosis and therapy of cancer» (м. Київ, 2016 р.); 40-ва ювілейній науково-практичній конференції молодих вчених Національної медичної академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупика з міжнародною участю, присвяченій «Дню науки» «Інновації в медицині: досягнення молодих вчених» (м. Київ, 2017 р.); Підсумковій LX науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини», присвячена 60-річчю Тернопільського державного медичного університету (м. Тернопіль, 2017 р.); XXIV міжнародном конгрессе асоціації гепато-панкреатобилиарних хірургів стран СНГ «Актуальные проблемы гепато-панкреатобилиарной хирургии» (м. Санкт-Петербург, 2017 р.); 19-th World Congress of International Society of Cryosurgery (Lithuania, Kaunas, 2017 р.);

68th Congress of the Association of Polish Surgeons (Cracow, 2017 p.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 17 наукових праць, з яких 3 статті у наукових фахових виданнях України, 2 статті у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, 4 статті у наукових виданнях інших держав, 6 тез наукових доповідей, 2 патенти на корисну модель України.

РОЗДІЛ 1
АНАЛІЗ СУЧАСНОГО СТАНУ ПРОБЛЕМИ
ХІРУРГІЧНОГО ЛІКУВАННЯ ПАЦІЄНТІВ З НЕЗАПАЛЬНИМИ
ЗАХВОРЮВАННЯМИ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ
(огляд літератури)

До групи запальних захворювань підшлункової залози (НЗПЗ) Сулак Я. М. відносять ряд неопластичних доброякісних та злоякісних (первинний рак чи метастази), дизонтогенетичних – істинні кісти, кістозний фіброз, та фіброзних – деякі різновиди хронічного панкреатиту, фіброз та цироз підшлункової залози захворювань [46]. Найнебезпечнішим НЗПЗ є рак підшлункової залози (РПЗ), що являється четвертою серед найбільш поширених причин смертності від злоякісних новоутворень в світі [59].

За прогнозами Rahib L., в США до 2030 року РПЗ стане другою провідною причиною смертності від злоякісних новоутворень [140]. За останні 30 років в Європі спостерігається тенденція до постійного зростання захворюваності і смертності унаслідок РПЗ як серед чоловічого, так і жіночого населення [126, 139]. Показник 1-річної виживаності у хворих з діагнозом РПЗ не перевищує 28 % [121], а рівень 5-річної виживаності – лише 1,2–6,0 % [76, 148].

Наведені дані пов'язані з особливостями перебігу РПЗ, що характеризується поступовою безсимптомною маніфестацією, швидким прогресуванням, високим ступенем злоякісності і раннім метастазуванням [166].

На момент встановлення діагнозу майже у 80 % хворих пухлина є нерезектабельною [90], що пов'язано з пізньою діагностикою захворювання та відсутністю ефективних методів скринінгу. Пацієнти, зазвичай, вперше звертаються в спеціалізовані медичні центри лише з появою ускладнень РПЗ, найчастішим з яких є механічна жовтяниця, що вимагає ендоскопічних втручань [47]. Тому, вже на момент встановлення діагнозу близько в 50 %

хворих виявляються віддалені метастази, а в 30 % – пухлина є локально поширеною через значні її розміри [133].

Радикальне хірургічне видалення пухлини є «золотим стандартом» лікування у пацієнтів з резектабельним РПЗ [156]. Однак, навіть після радикальної резекції з послідуною ад'ювантною хіміотерапією медіана виживаності є вкрай низькою – 20–24 міс. [158]. У 80 % випадків РПЗ представлений аденокарциномою протокового епітелію [121]. Лише в 15–20 % хворих з діагнозом протокова аденокарцинома підшлункової залози на момент встановлення діагнозу вдається виконати радикальну резекцію [76].

В 70–75 % випадків пухлина локалізується в ділянці головки ПЗ, в 15–20 % – в ділянці тіла та в 5–10 % локалізується в хвості залози [121].

При локалізації пухлини в головці ПЗ показана, т. з. «правобічна панкреатектомія», при якій виконується резекція головки ПЗ, дванадцятипалої кишки, центрального та дистального відділу загальної жовчної протоки з жовчним міхуром, антрального відділу шлунка, лімфаденектомія регіонарного лімфатичного колектора. При локалізації пухлини в лівому анатомічному сегменті ПЗ виконується дистальна резекція (ДР) зі спленектомією, а в англосаксонській літературі можна зустріти термін «лівобічна панкреатектомія». Під час виконання правобічної панкреатектомії важливим етапом операції є реконструктивний, що включає поетапне накладання панкреатоєюноанастомозу, гепатикоєюностомії та гастроентероанастомозу. Це оперативне втручання пов'язане з високим рівнем післяопераційних ускладнень – до 45 %, навіть у спеціалізованих високопрофільних центрах [73]. Найбільш частими ускладненнями є післяопераційний панкреатит культі ПЗ з порушенням евакуації вмісту виходу з культі шлунка (21 %), панкреатична норича (15 %) з наступними ерозивними кровотечами, що переважно спричиняють ранню післяопераційну летальності [12, 129]. Для зменшення частоти такого ускладнення, як панкреатична норича, автори пропонують різні варіанти анастомозів з культею ПЗ.

Надання переваги певному виду анастомозу не обґрунтовані, а

остаточний його вибір залишається на розсуд хірурга, спираючись на власний досвід [10].

R0-статус резекція є одним з найбільш важливих факторів, що впливає на віддалені результати лікування, а саме, показники загальної та безрецидивної виживаності (БВ) хворих [91]. Однак досягти R0-статусу резекції не завжди видається можливим. У дослідженні Verbeke С. та Esposito I. було показано, що частота R1-резекцій перевищує 75 % навіть у спеціалізованих центрах [88, 163].

Деякі автори пропонують навіть виконувати резекцію портальної вени усім хворим з локалізацією пухлини в правому анатомічному сегменті ПЗ з метою більш частого досягнення R0-статусу резекції [159]. Однак, відсутність рандомізованих досліджень, мета-аналізів не дають право клініцистам рутинно застосовувати запропоновану методику, а лише ще раз підкреслюють актуальність проблеми.

На думку Ian McConachie, анестезія, як і оперативне втручання, впливають на віддалені результати лікування онкологічних хворих [64]. Так, у дослідженні Gottschalk A. et al. вивчався зв'язок виду анестезії та появи рецидивів захворювання в онкологічних хворих після оперативного лікування [101]. Оперативне втручання може призводити до дисемінації пухлинних клітин у системний кровообіг, лімфатичну систему та прилеглі серозні порожнини [64, 153]. Компоненти імунної системи, такі як Т-клітини-кілери, відіграють важливу роль в попередженні пухлинної прогресії та появи метастазів, однак оперативне втручання за рахунок операційного стресу та больового синдрому в післяопераційному періоді призводять до супресії активності даних клітин [68]. Оперативне втручання з метою радикального видалення первинної злоякісної пухлини наразі є єдиним методом, що дає шанс пацієнту на повне одужання, однак існує думка, що саме оперативне втручання може сприяти активізації росту раніше існуючих мікрометастазів у метастази [131].

Відомо, що ад'ювантна хіміотерапія після R0- чи R1-резекції ПЗ продовжує загальну виживаність і входить у стандарти надання допомоги даної

категорії хворих [81]. Однак, не у всіх хворих чутливість пухлини до хіміопрепарату однакова, тому досить часто бажаного результату досягти не вдається. Тривають пошуки нових хіміопрепаратів, проводяться дослідження з вивчення нових схем, комбінацій хімотерапевтичних засобів [89, 169]. Існує думка, що проблема доставки хіміопрепарату в солідну пухлину ПЗ пов'язана з особливостями співвідношення між стромальними та паренхіматозними елементами самої пухлини. Так, Saluja A. K. et al. [146] вважають, що фіброзна тканина строми солідної пухлини ПЗ створює оптимальні умови для підтримання підвищеного інтерстиціального тиску рідини, що призводить до судинного колапсу і є істотним бар'єром на шляху перфузії хіміопрепарату в пухлинну тканину, створюючи додатковий рівень захисту для неоплазми. Тому актуальними на сьогодні є розробка методів локальної деструкції як паренхіматозних елементів солідної пухлини ПЗ, так і стромальних.

Сучасна хірургія РПЗ досягла свого апогею, однак віддалені результати лікування даної категорії хворих залишаються невтішними. За останні два десятиліття ми стали свідками незначного підвищення загальної виживаності, переважно завдяки досягненням в галузі хімотерапії РПЗ і розробки більш точних критеріїв відбору пацієнтів для операції [90].

Поліпшити віддалені результати лікування хворих на РПЗ у провідних колективах світу намагаються шляхом вдосконалення існуючих та розробки нових методів лікування, в т. ч. із застосуванням локальних методів впливу на пухлинну тканину.

1.1. Методи абляції пухлин підшлункової залози

Сьогодні в хірургії РПЗ застосовують наступні методи локальної абляції пухлини [142, 82]: радіочастотна абляція, необоротна електропорація, стереотаксична променева терапія, високоінтенсивна ультразвукова променева терапія, імплантація радіоактивного I^{125} (брахітерапія), фотодинамічна терапія, мікрохвильова абляція, кріоабляція, комбіновані методи абляції.

Радіочастотна абляція, мікрохвильова абляція, високоінтенсивна

ультразвукова променева терапія та кріодеструкція – це методи абляції, що засновані на механізмі температурного пошкодження пухлинної тканини.

Імплантація радіоактивного I^{125} , фотодинамічна терапія, незворотна електропорація, стереотаксична променева терапія – методи абляції, дія яких не заснована на механізмі температурного пошкодження, а базується на інших фізичних механізмах індукції пухлинної деструкції.

При незворотній електропорації електроди розміщуються довкола пухлини. Принцип абляції при застосуванні даного методу заснований на створенні коротких імпульсів струму високої напруги. Електричні імпульси викликають незворотні зміни біліпідного шару мембран злроякісних клітин, що призводить до порушення внутрішньоклітинного гомеостазу і тим самим індукує апоптоз [79]. В літературі описано низку ускладнень, пов'язаних з даним методом абляції: дуоденальна норичця, панкреатична норичця, жовчна норичця, тромбоз ворітної вени [142]. В дослідженні Narayanan G. описано два випадки виконання R0-резекції через 4 та 5 міс. після проведення черезшкірної незворотної електропорації пухлини у пацієнтів з первинно нерезектабельним локально-поширеним РПЗ.

Метод стереотаксичної променевої терапії базується на доставці високих доз точно сфокусованої радіаційної енергії до пухлинного осередку ПЗ за один чи декілька сеансів. Проблема абляції злроякісних пухлин ПЗ даним методом пов'язана з постійними рухами діафрагми, що передаються на осередок неоплазми. Виходом з положення стала імплантація золотої мітки в пухлину на етапі планування втручання. Мітка служить реперною точкою, з рухами якої синхронізується стереотаксичний апарат, за рахунок чого враховуються рухи діафрагми для досягнення максимальної точності опромінення лише пухлини без оточуючих здорових тканин [102]. Незважаючи на це, аналіз ускладнень, пов'язаних з проведенням стереотаксичної променевої терапії, вказує на їх широку варіацію: дуоденальні кровотечі, гастростаз, дуоденальна/шлункова непрохідність,

перфорація 12-палої кишки, виразки шлунка, тромбоз верхньої брижової вени, тромбоз нижньої порожнистої вени [151, 142].

Лише в одному дослідженні F. Polistina et al., в яке було включено 23 пацієнти з нерезектабельним локально-поширеним РПЗ і яким виконувалась стереотаксична променева терапія, вказується, що R0-резекцію вдалося виконати тільки у двох хворих. Одному хворому виконано розширену ліво-бічну панкреатектомію (хворий помер через 20 міс. від перитонеальної дисемінації), другому хворому виконано панкреатодуоденальну резекцію (ПДР) за Whipple з крайовою резекцією верхньої брижової вени (хворий помер через 17 міс. через появу метастазів у печінці та перитонеальну дисемінацію) [138].

Фотодинамічна терапія – це метод абляції, заснований на використанні світла для індукції тканинного некрозу. На початковому етапі пацієнту внутрішньовенно вводять фотосенсибілізуючий агент, після чого в пухлину черезшкірно встановлюється одне або декілька оптичних волокон. Лазерне світло передається через волокна, що індукує пухлинний некроз [144]. В доступних джерелах не знайдено випадків опису специфічних ускладнень, пов'язаних з проведенням даного типу абляції, а також не описано випадків виконання R0-резекцій ПЗ після проведеної фотодинамічної абляції.

Методика радіочастотної абляції полягає у введенні в центр пухлини одного або декількох електродів, по яких проводиться високочастотний змінний струм. На робочих поверхнях електродів, введених у пухлину, досягається температура від 60 °С до 100 °С [100]. Це призводить до термічної коагуляції, денатурації білка, і, таким чином, деструкції пухлини за рахунок індукції некрозу [78].

Застосування даної методики також пов'язане з низкою ускладнень, пов'язаних з топографо-анатомічними особливостями розташування головки ПЗ, а саме: близькість магістральних судин, дванадцятипалої кишки, позапечінкових жовчних проток. В дослідженні Paiella S. радіочастотну абляцію було виконано в 265 пацієнтів з локально-поширеним РПЗ, ускладнення розвинулись в 12,8 % хворих (n=34). Серед ускладнень

відмічались: дуоденальна нориця – 4 %, панкреатична нориця – 3 %, портомезентеріальний тромбоз – 2,6 %, гострий панкреатит – 2,2 %, жовчна нориця – 0,7 %, інші – 0,3 % [133].

При застосуванні високоінтенсивної ультразвукової променевої терапії, деструкція пухлинної тканини досягається за рахунок здатності ультразвукових хвиль фокусуватись і передаватись через щільні тканини в організмі. Пухлинна тканина, на яку сфокусовано дію ультразвукової хвилі, поглинає акустичну енергію і перетворює її в теплову, тим самим призводячи до клітинної загибелі через механізм нагрівання [65]. Використання зовнішнього джерела ультразвукової енергії дозволяє віднести даний метод до неінвазивних методів абляції.

При мікрохвильовій абляції електромагнітні хвилі індують фракційне нагрівання пухлинної тканини внаслідок осциляцій диполів молекул води [150].

Імплантація радіоактивного I^{125} – метод абляції, заснований на локальному радіаційному опроміненні пухлини, що веде до деструкції пухлинних клітин. При цьому безпосередньо в пухлину імпантуються частинки радіоактивного I^{125} [123]. Описано найбільш часті ускладнення, що траплялись при застосуванні даної методики: виразка шлунка, радіаційний ентерит, лімфатична нориця, транзиторна лихоманка, міграція частинок радіоактивного I^{125} в печінку [142].

Метод кріоабляції також заснований на термічному принципі, але деструкція пухлинної тканини в даному випадку викликана не теплом, а індукованим холодом [164]. На думку Ху К., основним недоліком кріоабляції ПЗ є неповна деструкція клітин в пограничній зоні, де важко досягти зниження температури нижче $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Прикладом комбінованого використання методів абляції є застосування імплантації радіоактивного I^{125} з наступною кріодеструкцією пухлини ПЗ. У дослідженні Ху К., 49-ти пацієнтам з місцево-поширеним РПЗ було виконано кріоабляцію в комбінації з брахітерапією I^{125} . Загальні показники

6-, 12-, 24- і 36-місячної виживаності склали 94,9, 63,1, 22,8 і 9,5 % відповідно. Порівняно з пацієнтами, яким виконувалась лише кріоабляція, комбіноване лікування показало більш високі показники 6- та 12-місячної виживаності та довшу медіану виживаності [168].

Недосконалість відомих методів локального впливу на пухлину ПЗ диктує необхідність пошуку нових і більш безпечних, вдосконалення існуючих методів, шляхом їх комбінації та розробки способів потенціювання деструктивного ефекту.

Часто в літературі кріоабляцією ще називають кріохірургію, розуміючи під цим терміном застосування дуже низьких температур з метою деструкції патологічної ділянки тканини [111].

1.2. Історія кріохірургії

Кріохірургія (від грец. *kryos* – холод, *cheir* – рука, *ergo* – дія, тобто рукоділля) – хірургічні методи лікування холодом, що застосовуються в різних галузях медицини [41].

Вплив холодом має таку саму багатовікову історію, як і сама медична наука. Перші згадки про застосування холоду в медицині зустрічаються в стародавніх Єгипетських папірусах [135].

У п'ятому столітті до н.е. Гіпократ писав, що холод можна застосовувати з лікувальною метою для купіювання ознак запалення, з метою анестезії при болях у суглобах, при переломах кісток, для зменшення кровотеч і т. ін. [160].

Про знеболюючі та протизапальні властивості холоду знали Цельс, Гален, Авіценна, які використовували його для лікування інфікованих ран, при переломах кісток, отриманих у бою, тощо [33].

Головний польовий хірург французької армії Жан-Домінік Ларрей, який брав участь у всіх військових кампаніях Наполеона Бонапарта в період війни 1812 р., помітив, що пораненим солдатам, які тривалий час знаходились у снігу, було можливо безболісно проводити ампутацію

ураженої кінцівки [160].

Основоположник воєнно-польової хірургії, М. І. Пирогов, під час Кримської війни (1853–1856 рр.) також широко використовував властивості холоду в лікуванні поранених. «Я действительно стал обкладываать всю конечность после резекций льдом...Я употреблял холод так же настойчиво и в сложных переломах, после ампутаций и даже во флегмонозных травматических рожках головы. Во льде у меня недостатка не было...», – так писав видатний хірург [42].

Баварський священик Себастьян Кнейп в своїй праці «Мое водолечение: средства для излечения болезней и сохранения здоровья» також торкається вивчення питання лікувальних властивостей холоду [29]. Поштовхом до досліджень цілющих властивостей холоду послужила історія, яка трапилась з самим автором цієї праці. С. Кнейп писав, що будучи хворим на запалення легень, він, виснажений сильним жаром, стрибнув в льодяну воду Дунаю, після чого дуже швидко пішов на поправку[33].

У IX ст. у Китаї під час правління династії Тан вперше використали нітрат калію (селітру), змішаний з сіркою і вугіллям, щоб зробити порох, в той час як саму селітру і воду було змішано і створено перший охолоджуючий агент [135].

Перші спроби лікування онкологічних захворювань із застосуванням низьких температур були зроблені в середині XIX ст. і пов'язані з ім'ям англійського лікаря James Arnott. У 1851 р. J. Arnott описав методику заморозки злоякісних пухлин, застосовуючи створений ним кріоаплікатор, що працював на суміші сольового розчину та подрібненого льоду (температура близько -21 °C). Застосовуючи цей метод для лікування раку шийки матки, молочної залози, деяких видів раку шкіри, автор відмічав зменшення розміру пухлин, зниження інтенсивності болювого синдрому, зменшення частоти кровотеч з пухлини. На Всесвітній виставці в Лондоні в 1851 р. його винахід був удостоєний золотою медаллю [66, 67, 70].

Вагомим поштовхом до прогресивного розвитку кріохірургічного

методу було відкриття рідкого азоту. У 1877 р. Louis Paul Cailletet у Франції і Raoul-Pierre Pictet в Швейцарії незалежно один від одного вперше при низькій температурі та високому тиску отримали зріджений кисень, а в подальшому й інші гази, у т. ч. рідкий азот [134].

Перевагою отриманого рідкого азоту перед сумішшю подрібненого льоду та солі були більш низькі температури ($T_{\text{кип. азоту}} = -195,8 \text{ } ^\circ\text{C}$), що давало можливість широко застосовувати його при лікуванні пухлин [71].

Сучасна кріохірургія має відносно коротку історію [33]. Відлік часу початку історії сучасної кріохірургії по праву пов'язаний з ім'ям американського нейрохірурга Irvin Cooper та інженера Arnold Lee. Результатом їх спільних зусиль стала розробка в 1961 р. першого кріохірургічного апарата, що працював на рідкому азоті ($-196 \text{ } ^\circ\text{C}$) [77].

За останні п'ятдесят п'ять років кріогенний метод отримав розповсюдження в різних галузях медицини і тісно пов'язаний з розробками в галузі фізики низьких температур, приладобудування та техніки. Основні фундаментальні роботи з вивчення впливу низьких температур на біологічну тканину виконано в другій половині ХХ століття.

В Україні розвиток кріохірургії пов'язаний з іменами таких відомих вчених як О. О. Шалімов, В. С. Земсков, О. І. Дронов, Г. В. Бондар, М. М. Корпан, О. О. Литвиненко, Я. В. Жарков, В. М. Запорожан, Б. П. Сандомирський, В. І. Грищенко та інші.

Сьогодні в Україні послідовником О. О. Шалімова являється О. І. Дронов, який активно розвиває кріохірургію в абдомінальній онкології, в т. ч. при хірургічному лікуванні злоякісних новоутворень ПЗ.

1.3. Кріофіксація пухлин підшлункової залози

В сучасній хірургічній практиці кріогенний метод локального впливу використовують для деструкції як доброякісних, так і злоякісних новоутворень у різних галузях медичної науки. Гідне місце кріохірургія

посідає при лікуванні хворих зі зляжисними новоутвореннями ПЗ [103]. Метод локальної кріодії застосовують, в основному, з паліативною метою при нерезектабельних локально-поширених солідних пухлинах ПЗ [103, 136] з метою купіювання больового синдрому, для зменшення пухлинної маси і т. ін. [166, 171].

Порівняно з іншими методами абляції зляжисних пухлин ПЗ, автори [118, 115] також вказують на безпечність методу кріодеструкції з мізерною кількістю ускладнень [115, 116, 118].

Ханевич М. Д. виділяє наступні методи локальної кріодії [52] при операціях у хворих на РПЗ: кріодія при виконанні радикальних операцій; кріодія, як самостійний метод лікування нерезектабельних пухлин; кріодія в поєднанні з біліодигестивним шунтуванням.

Перспективні є розробка нового напрямку кріохірургії ПЗ – кріофіксація пухлини, а саме – інтраопераційне застосування низькотемпературного локального впливу при радикальному хірургічному лікуванні резектабельних зляжисних солідних пухлин ПЗ.

Мізерна кількість робіт присвячена вивченню процесу кріофіксації пухлин в онкохірургії, не є винятком і панкреатологія. В англomовній літературі не знайдено, як самого терміна «кріофіксація» пухлини, так і його визначення. Незважаючи на те, що термін «кріофіксація» пухлини хоча і вкрай рідко, але зустрічається в спеціальній вітчизняній хірургічній літературі, однак його визначення дотепер не було описано.

Нами вперше запропоновано визначення даного терміна, що можна представити наступним чином. Кріофіксація – це кріохірургічний метод локального низькотемпературного впливу на резектабельну пухлину, перед її мобілізацією та видаленням з метою зменшення ризику інтраопераційної дисемінації пухлинних клітин, обумовленої хірургічною травмою неоплазми, за рахунок посилення антибластичного ефекту шляхом девіталізації пухлинних клітин, абластичного ефекту за рахунок «виключення» регіонарного пухлинного кровотоку [14].

В літературі зустрічається мізерна кількість робіт, із даними про застосування методу кріофіксації. Наприклад, Волов М. Б. описує застосування методу кріофіксації в нейрохірургії при лікуванні пухлин головного мозку [6, 38].

У проктології застосування методу кріофіксації описали Віннік Ю. А. та ін (2008 р.) при лікуванні раку прямої кишки. В їхньому дослідженні вивчались результати лікування 238 хворих на рак прямої кишки: I група – 86 хворим виконано черевно-промежину екстирпацію прямої кишки; II група – 119 – виконано черевно-анальну резекцію; III група – 33 хворих, яким перед мобілізацією та видаленням пухлини виконувалась кріофіксація. Показники летальності, результати 4-річної виживаності в групах достовірно не відрізнялись. Тому автори зробили висновок, що інтраопераційна кріофіксація пухлини не погіршує безпосередні та віддалені результати лікування хворих на рак прямої кишки [5].

Вплив інтраопераційної кріодеструкції пухлини на ЦПК та тривалість життя хворих на рак легень вивчали В. Д. Захаричев та В. Д. Ганусевич (2011 р.) із залученням 40 пацієнтів з периферичним раком легень, яким виконувалась інтраопераційна кріодеструкція пухлини. В результатах дослідження було показано, що частота виявлення ЦПК в регіонарному кровотоці пацієнтів, яким виконувалась інтраопераційна кріодеструкція в процесі радикального хірургічного втручання, зменшилась в 2 рази порівняно з контрольною групою, а рівень 5-річної виживаності майже в 2 рази перевищив виживаність у контрольній групі ($p < 0,05$). На думку авторів, заморожування пухлини сприяє кріофіксації пухлинних клітин, цим самим попереджуючи їх дисемінацію в системний кровообіг, що знижує ризик метастазування [25].

У 1996 р. Литвиненко О. О. оприлюднив результати попередньої деструкції пухлини ПЗ та промороження лінії розсічення тканини при її резекції. Запропонована ним кріогенна деструкція була виконана у 24 хворих, з них під час виконання ПДР – у 18 і у 6 – при ДР ПЗ. З-поміж оперованих

хворих ускладнення в післяопераційному періоді були відмічені у 14 хворих (26,4 %). Померло в ранньому післяопераційному періоді 3 хворих (5,66 %). Однак, віддалені результати лікування в роботі представлені не були [34].

Патютко Ю. І. та співавт. (2007) застосовували кріодеструкцію резектабельної пухлини головки ПЗ для виключення дисемінації при механічному пошкодженні пухлини під час її мобілізації, потім хворим виконували стандартну гастропанкреатодуоденальну резекцію. Дану методику було застосовано у двох хворих, тривалість життя першого хворого складала станом на травень 2006 року – 37 міс.; тривалість життя іншого хворого склала 22 міс. [39].

Ханевич М. Д. та співавт. (2011) описують у своїй роботі застосування кріодії рідким азотом у 34-х хворих на РПЗ, як перший етап радикального оперативного втручання: у 20 випадках виконана ПДР, в 11 – ДР, у 3 – панкреатектомія. 3-річна виживаність із застосуванням кріодії склала 21,5 %, без застосування кріодії – 13,3 %. На думку автора, застосування локальної кріодії на пухлину при радикальних хірургічних втручаннях з приводу РПЗ дозволяє покращити результати 3-річної виживаності, що, в першу чергу, пов'язано з підвищенням абластики під час хірургічних втручань [53].

Однак, використання низькотемпературної локальної дії при лікуванні злоякісних новоутворень не завжди гарантує досягнення повної деструкції пухлинних клітин у заданому об'ємі [48]. Тому тривалий час актуальним залишається пошук методів посилення кріодії, тобто розробка кріопотенціювання. Розуміння механізмів ефекту кріодеструкції пухлинних клітин може бути ключем до розв'язання даної проблеми.

1.4. Механізми ефекту кріодеструкції пухлин

Механізм кріодеструкції біологічної тканини – складний процес, при якому відбуваються фізико-хімічні та біологічні зміни в клітинах та тканинних елементах, що впливають на їх структуру та функцію, спричинюючи пошкодження [87, 96, 114].

На сьогодні вичерпного пояснення, єдиної думки щодо механізму кріодеструкції пухлинних клітин не існує [60]. Багатьма вченими запропоновано ряд гіпотез, в основі яких лежать фундаментальні експериментальні дослідження, більшість з яких виконана ще в другій половині XIX ст. [27, 96, 128].

Узагальнюючи дані літератури, можна виділити п'ять основних механізмів необоротної деструкції клітин, внаслідок заморожування [87]:

- механічне пошкодження клітинних мембран гострими кристалами інтрацелюлярного льоду;
- дегідратація клітин, внаслідок екстрацелюлярного утворення льоду та появи градієнта осмотичного тиску;
- денатурація фосфоліпідів клітинних мембран;
- припинення руху протоплазми, так званий «термальний шок»;
- локальне виключення кровотоку в ділянці тканини, яка заморожувалась, що веде до розвитку ішемічного некрозу.

У своїх працях Шафранов В.В. (2012) об'єднує відомі механізми клітинної загибелі внаслідок кріодеструкції у два типи ушкоджень тканини [60]:

- первинне ушкодження – пов'язане з безпосередньою деструкцією клітин патологічної ділянки тканини під впливом низьких температур;
- вторинне ушкодження – обумовлене порушенням гемодинаміки в ділянці тканини, що піддавалась низькотемпературному локальному впливу.

На думку Фесенко Е. Е. (2007), холодний вплив на клітину необхідно розглядати з урахуванням температури замерзання тканинної рідини [51]. Для тканин організму людини ця температура знаходиться в межах $-0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$... $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ [78]. Процеси, що відбуваються в клітині під час локальної кріодії, значно відрізняються, коли діапазон температур вище або нижче точки замерзання тканинної рідини. Якщо температура в клітині різко знижується в декілька десятків разів, але не досягається точка замерзання, то починають

утворюватись CSD-білки «холодового шоку», в людини це білок YB-1 [49]. Ці білки забезпечують адаптацію клітин до нових температурних умов існування, виконуючи в клітині численні функції. При холодоровому шоківі такі клітинні процеси, як транскрипція та трансляція, зупиняються, однак, білок YB-1 відновлює цей процес та дає змогу клітині знову нормально функціонувати в нових умовах [4].

Під час локальної кріодії на біологічну тканину зміни відбуваються також на рівні мембрани клітин. Загалом, мембрана клітин є непроникною, за винятком ділянок, пронизаних інтегральними білками. При зниженні температури ліпіди мембрани клітин трансформуються у фазу гелю – структури з малою вільною енергією. Під час цього процесу інтегральні білки відриваються та втрачають здатність контролювати трансфер молекул та іонів через мембрану клітини. Мембрана стає більш проникною, що дає змогу іонам рухатись як у клітину, так і з її цитоплазми, значно легше. В результаті, іонний склад клітин різко змінюється, що при подальшому зниженні температур призводить до їх пошкодження та загибелі [164].

До основного механізму первинного ушкодження клітин вчені відносять процес утворення кристалів льоду в біологічній тканині [107, 111]. Процес кристалоутворення залежить від швидкості охолодження та наступного відігрівання. Під час локальної кріодії утворення кристалів льоду розпочинається в міжклітинному просторі, оскільки протективні властивості біліпідного шару мембрани клітин не дають можливості розпочатись інтрацелюлярному процесу кристалоутворення [110]. Збільшення об'єму кристалів льоду в міжклітинному просторі спричиняє зростання концентрації електролітів у міжклітинній рідині, де лід ще не утворився. Це викликає появу градієнта осмотичного тиску на рівні клітинної мембрани, що призводить до виходу води з клітини. Якщо швидкість охолодження мала, то вода встигає вийти з клітини, внаслідок чого вона дегідратується. При подальшому охолодженні, через зневоднення, у протоплазмі даних клітин не можуть утворитись кристали льоду. Якщо швидкість заморозки

висока, то вода не встигає достатньо швидко виходити з клітин. Внаслідок цього, на фоні утворення кристалів льоду в міжклітинному просторі, розпочинається внутрішньоклітинна кристалізація. При швидкому охолодженні утворені кристали льоду мають невеликі розміри та високу поверхневу енергію [128, 164].

Пошкодження клітин продовжується також на етапі відтавання. Деструкція клітин проходить при цьому не менш інтенсивно, ніж при заморожуванні, оскільки при відігріванні розвивається так звана «рекристалізація» кристалів інтрацелюлярного льоду [109]. При повільному відігріванні дрібні кристали інтрацелюлярного льоду продовжують зростати. Чим довше триває відтавання, тим більшими стають кристали інтрацелюлярного льоду внаслідок процесу рекристалізації та травмують мембрану клітини, у т. ч. її ядро [95].

Вторинне ушкодження біологічної тканини при низькотемпературному локальному впливі пов'язане з пошкодженням мікроциркуляторного русла тканини та розвитком у подальшому осередку ішемічного некрозу [114]. Під час локальної кріодії на пухлину, недостатності мікроциркуляції передуює каскад подій: деструкція ендотеліального шару стінки судини; підвищена їх проникність для плазми крові, що викликає інтерстиціальний набряк тканини; агрегація тромбоцитів; утворення мікротромбів; облітерація судин [108].

Використовуючи радіоізотопний метод, ще в 1976 році Л. П. Кіндзельський в своїй роботі показав, що в ділянці тканини, яка піддавалась впливу локальної кріодії, мають місце грубі порушення обміну рідини між тканиною та внутрішньосудинною рідиною. Підвищується надходження та нагромадження в міжклітинній рідині білка сироватки крові при різко зниженій швидкості відтоку рідини з осередку кріодеструкції в системний кровообіг [28].

Більш детальний опис змін, що виникають у судинному руслі біологічної тканини, в т. ч. пухлинного генезу, представили Пушкарь Н. С. та

Сандомирський Б. П. (1982) [44].

Після відтавання, в просвіті судин мікроциркуляторного русла, на які здійснювався вплив субнульових температур, з'являються емболи, що пов'язано з підвищеною концентрацією газів під час заморожування. Внутрішньосудинний стаз та складж є основними проявами порушення мікрогемодинаміки через декілька хвилин після локальної кріодії.

Найбільш виражений процес тромбоутворення спостерігається в судинах, що відповідають за відтік венозної крові, і в часі цей процес збігається з вазодилатацією, що змінює спазм.

Об'єм та кількість тромбів збільшується і вони можуть повністю закрити просвіт судини. Після цього кровоток здійснюється лише в напрямку ще функціонуючих капілярів, що можна пояснити, як «маятникоподібний» рух крові. Через 30 хв розвивається повний судинний стаз та починає утворюватись ділянка ішемічного некрозу [44].

Таким чином, місцева зупинка кровотоку в пухлині пов'язана з тромбуванням судин малого діаметра внаслідок низькотемпературного локального впливу. На противагу цьому, стінка магістральних судин є високорезистентною до низьких температур, тому кровоток у цих судинах повністю відновлюється після розморожування [34].

Розуміння механізмів кріодеструкції солідних пухлин дало змогу розробити принципи кріохірургії, при дотриманні яких можливо досягти найкращого ефекту локальної кріодії: активне швидке заморожування, пасивне повільне спонтанне відтавання, повторення циклів кріодії «заморожування-відтавання» [48].

Однак, незважаючи на досягнуті успіхи та дотримання вищенаведених принципів, часто не вдається досягти повної загибелі клітин в заданому об'ємі патологічної ділянки тканини [61, 60, 45].

Тривалий час актуальним залишається пошук ефективних методів посилення локальної кріодії.

1.5. Методи потенціювання локальної кріодії на біологічну тканину

Раніше вважали, що в об'ємі тканин в межах льодяної кулі під час локальної кріодії, гарантовано розвиваються необоротні зміни унаслідок їх рівномірного руйнування [98, 99]. Так, у роботі Жолобова М. И. (1994), при проведенні експериментальних досліджень *in vivo* на моделі безпородних собак було показано, що деструкція клітин у тканині ПЗ розпочинається при мінімальній критичній температурі, яка складає $T_{кр} = (-2 \pm 1,5) \text{ } ^\circ\text{C}$, а зона заморозки практично збігається із зоною некрозу [24]. Однак, результати експериментальних досліджень не завжди можна екстраполіювати в клінічну практику через спотворення дійсності, внаслідок недосконалості моделей.

Подальший розвиток кріохірургії, критичний аналіз експериментальних даних та накопичення клінічного досвіду застосування кріохірургічних технологій показав, що розмір зони деструкції завжди менший від зони заморожування [164]. Винятком є лише тканина головного мозку, де відмічено збіг об'єму льодяної кулі із зоною повної деструкції клітин [27].

Під час проведення кріохірургічного втручання плоскими аплікаторами Чжао А. В. (2015) виділяє 3 зони впливу, які графічно представлено на рисунку 1.1 [58].

В своїй роботі Трушина В. А. (1984) пояснює невідповідність зон заморозки та деструкції наступним чином. До найбільш низьких рівнів температури охолоджуються лише ті ділянки тканини, що знаходяться в безпосередній близькості з робочою поверхнею кріоінструмента. Клітини тканини, що знаходяться на периферії зони заморожування, охолоджуються до температур, близьких до температури замерзання (для тканин людини це температура від $-0,5 \text{ } ^\circ\text{C}$ до $-2 \text{ } ^\circ\text{C}$). Відповідно до цього, в безпосередній близькості до кріоінструмента реалізуються високі швидкості охолодження тканини, що становлять $100 \text{ } ^\circ\text{C}$ за хвилину і вище, а на периферії зони заморожування – низькі, – декілька градусів за хвилину. В інших ділянках тканин у межах зони кріодії досягаються проміжні значення температур і швидкості охолодження [48].

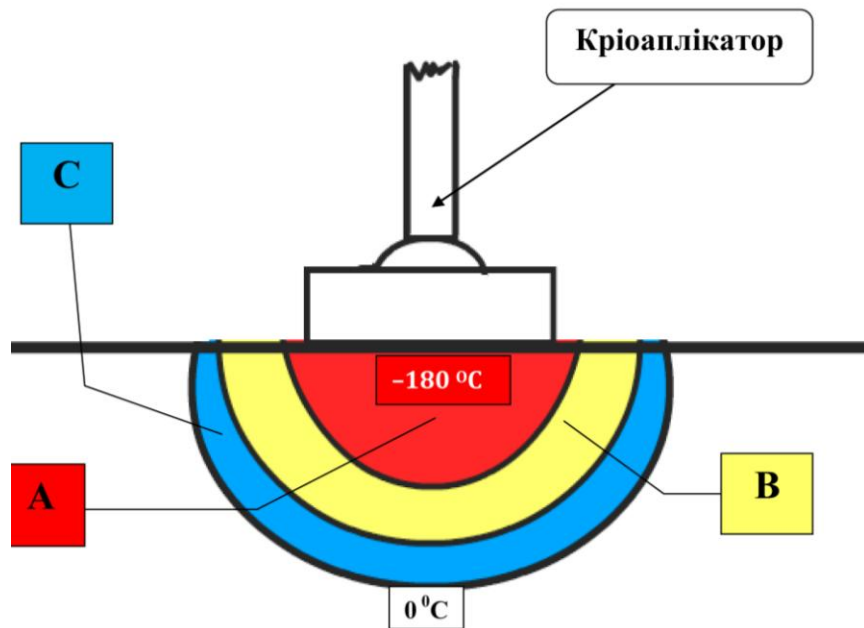


Рис. 1.1. Умовні зони розподілу кріопшкодження при проведенні локальної кріодії на біологічну тканину плоским аплікатором:

А – зона прямої кріодеструкції (глибокої заморозки), розміщена безпосередньо під кріоаплікатором (15–40 мм, $t = -180\text{ }^{\circ}\text{C}$), спостерігається найбільша кількість ушкоджених клітин;

В – перехідна зона або зона часткового пошкодження клітин (10–20 мм, t не нижче $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$), більше 50 % клітин після відтавання зберігають свою життєздатність;

С – погранична зона або зона дегідратації клітин (до 10 мм, $t = 0\text{ }^{\circ}\text{C} \dots -20\text{ }^{\circ}\text{C}$), охолодження в цій зоні проходить повільно, кристалоутворення відбувається лише в міжклітинному просторі, більшість клітин у цій зоні залишаються життєздатними.

На думку Ху К., основним недоліком кріоабляції пухлин ПЗ є неповна деструкція клітин в пограничній зоні, де важко досягти температури нижче мінус $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ [164].

Топографічні особливості локалізації ПЗ, а саме, близькість її розташування до таких магістральних судин як аорта, нижня порожниста вена, ворітна вена та їхніх гілок, значно обмежують можливості повноцінного проведення кріофіксації солідних злоякісних пухлин в даному

органі, особливо в дорзальній частині правого анатомічного сегмента. Це пов'язано з потужним кровотоком у вище наведених магістральних судинах, що обумовлює інтенсивне теплоприведення в ділянці дорзальної частини правого анатомічного сегмента ПЗ.

Методика кріофіксації резектабельних солідних злоякісних пухлин ПЗ, залежно від їх локалізації та розмірів, залишається не розробленою, так само як і доступні, практичні у застосуванні для клініцистів методи ефективного потенціювання локальної кріодії на ПЗ.

В арсеналі сучасної кріохірургії є наступні методи посилення кріодеструкції:

- повторення циклів «заморозка-відтавання» [48];
- введення в тканину розчину лідокаїну, новокаїну, адреналіну, дицинону [8];
- створення попередньої ішемії в тканині:
 - 1) судинна ізоляція [3];
 - 2) ендovasкулярна оклюзія судин, що живлять пухлину [63];
- поєднання локальної кріодії з іншими фізичними методами впливу:
 - 1) ультразвукове випромінювання [23];
 - 2) надвисокочастотне електромагнітне поле (НВЧ-ЕМП) [62, 63];

В своїй роботі Циганов Д.І. (1994) вказує, що основний вплив на показник теплофізичних властивостей тканини визначає її компонентний склад і, в першу чергу, – вміст води, чим її більше в тканині, тим ближче значення теплофізичних властивостей тканини до теплофізичних властивостей води та льоду [57].

Оскільки мішенню при кріодеструкції є саме вода, то найбільше холодове пошкодження реалізується в тканинах зі значним її вмістом. Воду, що міститься в тканинах, які піддаються кріодеструкції, Шафранов В. В. и соавт. розділяє на три умовних типи [60]:

- вільна вода – перетворюється в лід при температурі від 0 до -15 °C;
- зв'язана вода:

1) слабо зв'язана вода – перетворюється в лід в діапазоні мінусових температур від $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$;

2) щільно зв'язана вода (незамерзаюча вода) – лід не утворюється навіть при $-200\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Саме вміст вільної та слабо зв'язаної води в тканині визначає її толерантність до кріопошкодження.

Враховуючи аналіз вітчизняної та закордонної літератури, вважаємо перспективним розвиток відносного нового напрямку кріохірургії – кріофіксації резектабельних злоякісних неоплазій ПЗ. Метод кріофіксації при хірургічному лікуванні хворих з резектабельною протоковою аденокарциномою підшлункової залози (ПАПЗ) залишається остаточно не розробленим та потребує оптимізації шляхом створення ефективного, доступного, практичного для клініцистів-хірургів методу потенціювання локальної кріодії залежно від локалізації та розмірів пухлини в ПЗ. Не визначеним також залишається показник критичної температури первинного пошкодження клітин ПАПЗ під час кріофіксації.

На наш погляд, великий потенціал приховує в собі дистильована H_2O , яка є гіпотонічним розчином, а на фармацевтичному ринку України представлена доступним препаратом – «Вода для ін'єкцій». Відоме застосування дистильованої H_2O для проведення перитонеального лаважу з метою профілактики канцероматозу очеревини під час онкологічних операцій [117, 157]. В роботі Kudoі M. (2016) описано цитоцидний ефект, що чинить дистильована H_2O при контакті з ПК, що веде до гіпотонічного шоку та розриву мембрани [119, 147].

Нами висунуто гіпотезу, що саме введення дистильованої H_2O в солідну пухлину ПЗ напередодні проведення інтраопераційної кріофіксації може посилити ефект кріодеструктивної дії за рахунок гідратації та осмотичного набряку клітин. Цим самим, збільшення вмісту в клітині води, дасть змогу на етапі спонтанного відтавання пухлини, утвореним інтрацелюлярно кристалам льоду продовжувати зростати за рахунок процесу

«рекристалізації» та пошкоджувати ультраструктурні клітинні елементи. А сама гідратація пухлини теоретично може призвести до більш глибокого зміщення ізотерм критичної температури кріопошкодження пухлинних клітин за рахунок збільшення теплопровідності пухлинної тканини.

Для отримання відповідей на поставлені запитання, необхідна розробка способу реєстрації температур в біологічній тканині на дискретних глибинах від робочої поверхні кріоаплікатора та проведення низки експериментальних досліджень з вивчення властивостей дистильованої H_2O як *in vivo*, так *in vitro* під час процесу кріофіксації.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Дизайн клінічного дослідження

В основу роботи покладено аналіз результатів діагностики, лікування та спостереження за 97 хворими з НЗПЗ, які були проліковані в період з 2010 до 2017 р. в Київському міському центрі хірургії захворювань печінки, жовчних протоків та підшлункової залози імені В. С. Земскова при Київській міській клінічній лікарні №10, що є клінічною базою кафедри загальної хірургії № 1 Національного медичного університету імені О. О. Богомольця.

Всі дослідження були погоджені з етичною комісією Національного медичного університету імені О. О. Богомольця та КМКЛ № 10 (протокол № 93 від 11 березня 2016 р.). Усі хворі, залучені в дослідження, добровільно надали згоду на участь в ньому шляхом підписання поінформованої згоди.

Залучення пацієнтів у дослідження проводили згідно з чітко розробленими критеріями включення, невключення та виключення.

Критерії включення хворого в дослідження:

- вік хворого 18–85 років;
- вперше в житті діагностована резектабельна злоякісна солідна пухлина підшлункової залози;
- відсутність інвазії пухлини в магістральні судини, навіть при можливості виконання їх реконструкції чи протезування;
- гістологічний тип пухлини – протокова аденокарцинома підшлункової залози;
- локалізація пухлини – головка, тіло, хвіст ПЗ;
- відсутність критеріїв невключення та виключення;
- добровільна інформована згода хворого на участь у дослідженні.

Критерії невключення:

- невідповідність хворого хоча б одному з критеріїв включення;
- локалізація пухлини в крючкоподібному відростку, ділянці перешийка ПЗ;
- мультифокальне ураження пухлинним процесом ПЗ;
- поширення пухлини головки чи тіла ПЗ на ділянку її перешийка;
- первинно-множинний синхронний та метасинхронний рак двох різних локалізацій на момент встановлення діагнозу РПЗ;
- наявність інших злоякісних новоутворень в анамнезі;
- проведена неoad'ювантна хіміотерапія чи інші локальні методи абляції пухлини до радикальної резекції ПЗ;
- наявність протипоказів до виконання радикальної резекції ПЗ;
- декомпенсована недостатність хоча б однієї з систем організму (серцево-судинна, дихальна, печінкова, ниркова недостатність тощо) або будь-яка їх комбінація.

Критерії виключення:

- інтраопераційно було виявлено ознаки нерезектабельності пухлини, що не були діагностовані до операції;
- тотальне ураження пухлиною ПЗ, що не було діагностовано до операції сучасними методами візуалізації;
- виявлені макроскопічно інтраопераційно віддалені метастази або канцероматоз очеревини, що не були діагностовані до операції;
- виявлено інтраопераційно ознаки інвазії пухлини ПЗ в магістральну (і) судину, що за умови технічної можливості виконання резекції залози вимагало їх реконструкції або кріоабляції;
- за результатами патогістологічного дослідження отримано гістологічний тип пухлини, відмінний від ПАПЗ;
- відмова хворого на будь-якому етапі дослідження продовжувати брати в ньому участь;

– недотримання хворим комплаєнсу діагностичного алгоритму, лікування та післяопераційного нагляду.

Дослідження було розподілено на 3 етапи: на **1-му етапі** (2010–2015 рр.) хворим з резектабельною солідною пухлиною ПЗ виконували класичний варіант резекції залози, тип якої залежав від локалізації пухлини; на **2-му етапі** (2015–2016 рр.) – проводили кріофіксацію пухлини з наступним виконанням резекції ПЗ, тип якої визначався локалізацією пухлини; на **3-му етапі** (2016–2017 рр.) проводили посилення процесу кріофіксації, шляхом попереднього введення в пухлину дистильованої H_2O з наступним виконанням кріофіксації та резекції ПЗ.

Усіх хворих, включених в дослідження в період з 2010 по 2017 рр., було розподілено на 3 групи – дві порівняння та одну основну (рис. 2.1).

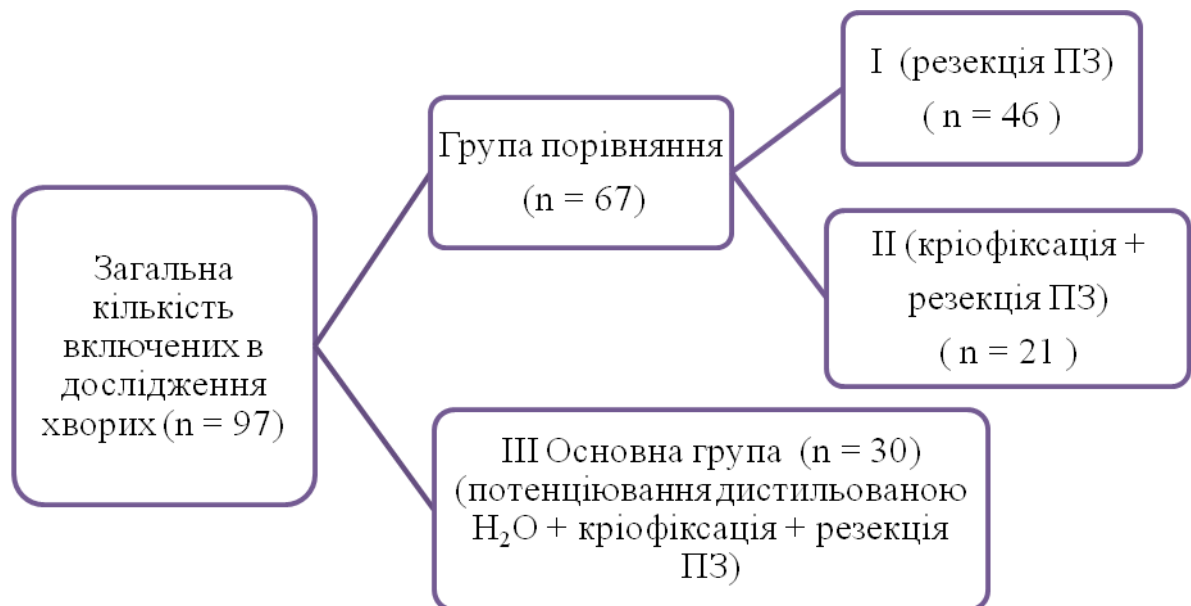


Рис. 2.1. Схема розподілу на групи, включених в дослідження хворих, у період з 2010 по 2017 рр.

Розподіл визначався періодом дослідження та був обумовлений характером проведеного хірургічного втручання, що виконувалось в кожного окремо взятого хворого.

Для подальшої зручності сприйняття представлених даних, сформовані групи хворих були позначені наступним чином:

- «**P**» – група порівняння хворих першого періоду дослідження (2010–2015 рр.), яким виконувався той чи інший тип **резекції** ПЗ за стандартною, загальноприйнятою на той момент часу методикою (n=46);
- «**K+P**» – група порівняння хворих другого періоду дослідження (2015–2016 рр.), яким виконували **кріофіксацію** пухлини за загальноприйнятою на той момент часу методикою з наступним виконанням **резекції** ПЗ, тип якої визначався локалізацією пухлини (n=21) [81];
- «**Д+K+P**» – основна група хворих третього періоду дослідження (2016–2017 рр.), яким спочатку проводили посилення процесу кріофіксації, шляхом попереднього введення в пухлину **дистильованої Н₂О** з послідуочим виконанням **кріофіксації** та **резекції** ПЗ (n=30).

Групи порівняння (P), (K+P) та основну групу (Д+K+P) в свою чергу було розподілено на дві підгрупи: **підгрупа I** та **підгрупа II**.

Розподіл хворих кожної із сформованих груп на підгрупи був обумовлений локалізацією пухлини: у підгрупу I увійшли хворі з локалізацією пухлини в проксимальному відділі ПЗ (головка); у підгрупу II – з локалізацією в дистальному відділі ПЗ (тіло, хвіст, межа тіла-хвоста).

2.2. Загальна характеристика хворих

Група порівняння (P) складала 47,4 % від загальної кількості хворих, включених в дослідження, група порівняння (K+P) – 21,6 %, основна група (Д+K+P) – 31 %.

Із загальної кількості включених в дослідження хворих 97 (100 %): чоловіків 53 (54,6 %), жінок – 44 (45,4 %).

Розподіл по групах був наступний:

- у групі (P) частка чоловіків складала 23 (50 %), жінок – також 23 (50 %);
- у групі (K+P) чоловіків – 13 (61,9 %), а жінок – 8 (38,1 %);

– у групі (Д+К+Р) частка чоловіків – 17 (56,7 %), жінок 13 (43,3 %).

Наведені дані представлено у вигляді діаграми (рис. 2.2).

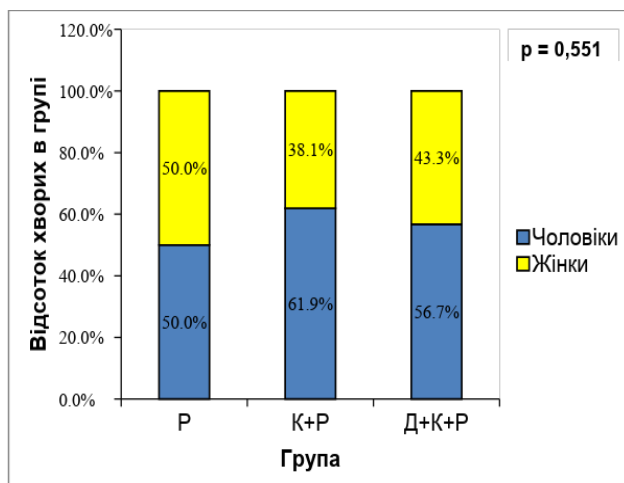


Рис. 2.2. Розподіл хворих у групах (Р), (К+Р) та (Д+К+Р) за статтю.

Статистичний аналіз даних, представлених на рисунку 2.2, для виявлення відмінностей між групами виконано в пакеті MedStat з використанням критерію хі-квадрат ($\chi^2 = 1,19$, число ступенів вільності $k=2$). Різниця між групами за статевим розподілом не є достовірною на рівні значущості, $p=0,551$. Середній вік всіх хворих, включених у дослідження ($n=97$), складав ($60,4 \pm 1,1$) роки (95 % ВІ: 58,3–62,6). Віковий розподіл у групах порівняння (Р), (К+Р) та основній групі (Д+К+Р) представлено у вигляді стовпчикової діаграми (рис. 2.3).

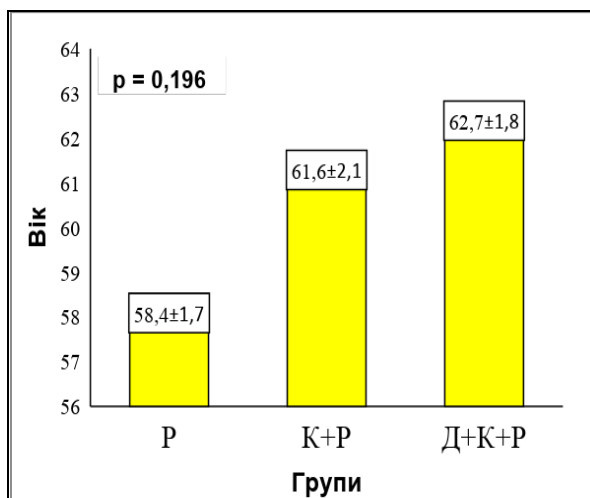


Рис. 2.3. Середній вік хворих у групах порівняння (Р), (К+Р) та основній групі (Д+К+Р).

В групі (P) середній вік складав ($58,4 \pm 1,7$) років (95 % ВІ: 55–61,8), у групі (K+P) – ($61,6 \pm 2,1$) років (95 % ВІ: 57,1–66,1); у групі (Д+K+P) – ($62,7 \pm 1,8$) років (95 % ВІ: 59–66,5). За методом множинних порівнянь середнього віку хворих для трьох вибірок проведено дисперсійний аналіз, достовірної різниці між групами (P), (K+P) та (Д+K+P) за віком не виявлено, $p=0,196$.

Розподіл всіх хворих, включених у дослідження, за віком та статтю наведено в таблиці 2.1, за основу розподілу було взято класифікацію вікових періодів (ВООЗ, 2016). При аналізі даних з таблиці 2.1 відзначено переважання хворих середнього та похилого віку – 85,6 % (83 з 97) порівняно з молодого та старечого віку – 14,4 % (14 з 97).

Таблиця 2.1

**Розподіл хворих з резектабельним РПЗ, включених в дослідження
в період з 2010 по 2017 рр. за віковим періодом та статтю**

| Вік, років | Загальна кількість хворих (n=97) | | | | | |
|---------------------|----------------------------------|------|-------|------|--------|------|
| | чоловіки | | жінки | | всього | |
| | n | % | n | % | n | % |
| Молодий (18–44) | 6 | 6,2 | 1 | 1 | 7 | 7,2 |
| Середній (45–59) | 25 | 25,8 | 10 | 10,3 | 35 | 36,1 |
| Похилий (60–74) | 19 | 19,5 | 29 | 30 | 48 | 49,5 |
| Старечий (75–90) | 3 | 3,1 | 4 | 4,1 | 7 | 7,2 |
| Разом | 53 | 54,6 | 44 | 45,4 | 97 | 100 |

Соціальна значимість проблеми обумовлена тим, що більше третини хворих на НЗПЗ – 42 (43,3 %) склали особи молодого та середнього віку, тобто працездатного віку. Також, варто відмітити наступне спостереження, що серед включених в дослідження пацієнтів у віковому періоді 18–44 роки відмічається значне переваження хворих чоловічої статі над жіночою, що склало 85,7 % (6 хворих з 7) проти 14,3 % (1 хвора з 7) відповідно.

Розподіл хворих за статтю залежно від локалізації пухлини (табл. 2.2). При визначенні меж ПЗ дотримувались рекомендацій Американського об'єднаного комітету з онкології (AJCC) [142].

Таблиця 2.2

**Розподіл хворих за статтю
залежно від локалізації пухлини відносно відділів ПЗ**

| Локалізація пухлини в ПЗ | Загальна кількість хворих (n=97) | | | | | |
|--------------------------|----------------------------------|------|-------|------|--------|------|
| | чоловіки | | жінки | | всього | |
| | п | % | п | % | п | % |
| Головка | 42 | 43,3 | 28 | 28,9 | 70 | 72,2 |
| Тіло | 3 | 3,1 | 8 | 8,2 | 11 | 11,3 |
| Хвіст | 3 | 3,1 | 4 | 4,1 | 7 | 7,2 |
| На межі тіла-хвоста | 5 | 5,2 | 4 | 4,1 | 9 | 9,3 |

Аналізуючи дані таблиці 2.2, можна відзначити значне переважання проксимальної локалізації солідних пухлин ПЗ як серед чоловіків, так і жінок, що складає 43,3 % та 28,9 % відповідно, яка у чоловіків спостерігається дещо частіше, ніж у жінок.

Враховуючи особливості ембріонального розвитку ПЗ та пов'язані з цим різні джерела кровопостачання вентрального та дорзального зачатків, у подальшому залоза буде розглядатись саме в контексті дистального та проксимального її відділів.

Для порівняння розподілу хворих чоловічої та жіночої статі за локалізацією пухлини відносно проксимального та дистального відділів ПЗ використовували критерій χ^2 . Отримано $\chi^2_{\text{факт.}}=2,19$, число ступенів вільності $k=1$. Різниця розподілу не є достовірною на рівні значущості, $p=0,139$.

Згідно з критеріями включення та невключення в дослідження в період 2010–2017 рр. було залучено 72,2 % (70 з 97) пацієнтів з проксимальною локалізацією пухлини (головка ПЗ) та 27,8 % (27 з 97) з локалізацією пухлини в її дистальних відділах (тіло, хвіст, на межі тіла-хвоста). Відмічається значне переважання хворих з локалізацією пухлини в головці ПЗ, що корелює із статистичними даними інших країн (рис. 2.4).

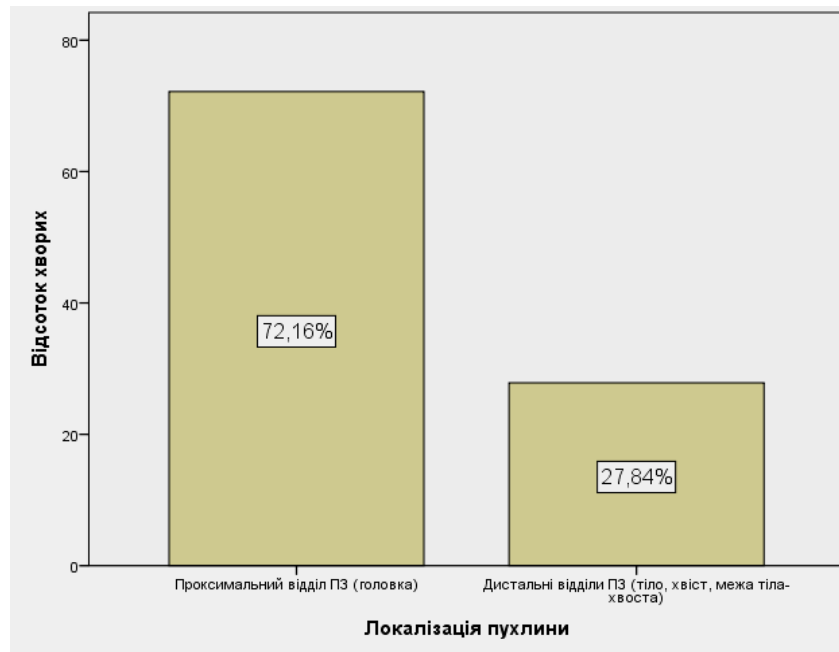


Рис. 2.4. Локалізація пухлини ПЗ відносно проксимального та дистального її відділів у хворих на НЗПЗ (n=97).

Розподіл хворих в групах порівняння (Р), (К+Р) та основній групі (Д+К+Р) за локалізацією пухлини відносно проксимального та дистального її відділів представлено в таблиці 2.3 та у вигляді діаграми на рисунку 2.5. Відмічається переважання проксимальної локалізації пухлини над дистальною в кожній групі хворих на НЗПЗ.

Таблиця 2.3

Розподіл хворих за локалізацією пухлини відносно відділів ПЗ

| Відділ ПЗ | Група хворих | | | | | |
|---|----------------------------|------|------------------------------|------|-----------------------|------|
| | Група порівняння (Р), n=46 | | Група порівняння (К+Р), n=21 | | основна (Д+К+Р), n=30 | |
| | n | % | n | % | n | % |
| Проксимальний (головка) | 35 | 36,1 | 14 | 14,4 | 21 | 21,6 |
| Дистальний (тіло, хвіст, на межі тіла-хвоста) | 11 | 11,3 | 7 | 7,2 | 9 | 9,3 |

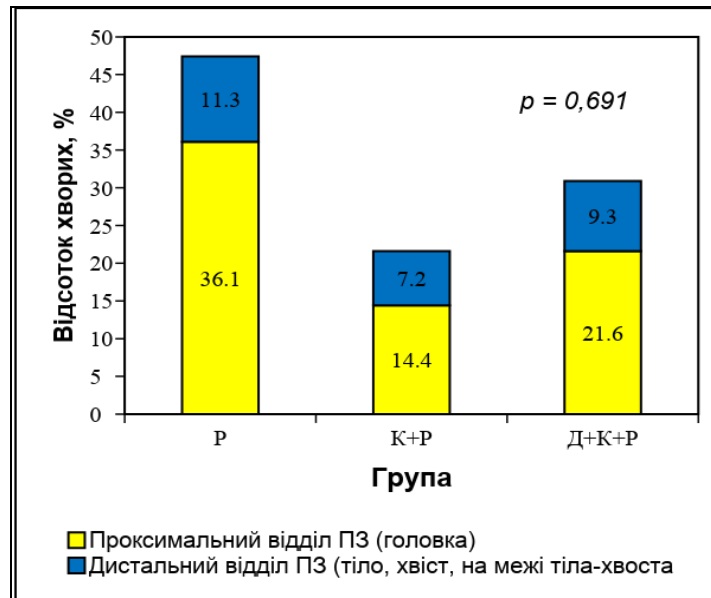


Рис. 2.5. Розподіл хворих у групах порівняння (Р), (К+Р) та основній групі (Д+К+Р) за локалізацією пухлини ПЗ відносно проксимального та дистального відділів.

При порівнянні розподілу хворих за локалізацією пухлини відносно проксимального та дистального відділів ПЗ в групах порівняння (Р), (К+Р) та основній групі (Д+К+Р) використовували критерій χ^2 . Отримано $\chi^2_{\text{факт.}}=0,74$, число ступенів вільності $k=2$. Різниця розподілу не є достовірною на рівні значущості, $p=0,691$. Таким чином, групи є репрезентативними за локалізацією пухлини відносно проксимального та дистального відділів ПЗ.

При розподілі хворих на РПЗ за стадією пухлинного процесу використовували класифікацію злоякісних пухлин за системою TNM 7-го перегляду [152].

Враховуючи те, що серед критеріїв невиключення хворих у дослідження були: інвазія пухлини ПЗ в магістральні судини, наявність віддалених метастазів, канцероматоз очеревини, тому в таблиці 2.4 відсутні пацієнти з III та IV стадією захворювання. Відсутність у всіх групах хворих з IA стадією, тобто пухлиною, локалізованою в ПЗ розміром менш ніж 2 см зумовлена пізньою діагностикою, відсутністю ефективних методів скринінгу даного захворювання. При подальшому аналізі даних з таблиці 2.4 варто відзначити, що частота встановлення ІА та ІВ стадії у хворих на

резектабельний РПЗ суттєво не відрізняється і становить 35,0 % (34 хворих з 97) та 36,1 % (35 хворих з 97) відповідно.

Таблиця 2.4

Розподіл хворих в групах порівняння (Р), (К+Р) та основній групі (Д+К+Р) за стадією згідно з TNM-7

| Стадія (TNM-7) | Група хворих (n=97) | | | | | | Загалом | |
|----------------|----------------------|------|------------------------|------|-----------------------|------|---------|------|
| | порівняння (Р), n=46 | | порівняння (К+Р), n=21 | | основна (Д+К+Р), n=30 | | | |
| | n | % | n | % | n | % | n | % |
| IA | 0 | – | 0 | – | 0 | – | 0 | – |
| IB | 15 | 32,6 | 6 | 28,6 | 7 | 23,3 | 28 | 28,9 |
| IIA | 19 | 41,3 | 5 | 23,8 | 10 | 33,3 | 34 | 35 |
| IIB | 12 | 26,1 | 10 | 47,6 | 13 | 43,4 | 35 | 36,1 |
| Разом | 46 | 100 | 21 | 100 | 30 | 100 | 97 | 100 |

При порівнянні розподілу хворих за стадією пухлинного процесу в групах порівняння (Р) та (К+Р) і основній групі (Д+К+Р) використовували критерій χ^2 . Отримано $\chi^2_{\text{факт.}}=4,32$, число ступенів вільності $k=4$. Різниця розподілу не є достовірною на рівні значущості, $p=0,364$. Таким чином, групи є репрезентативними за стадією пухлинного процесу згідно з TNM-7 (рис. 2.6).

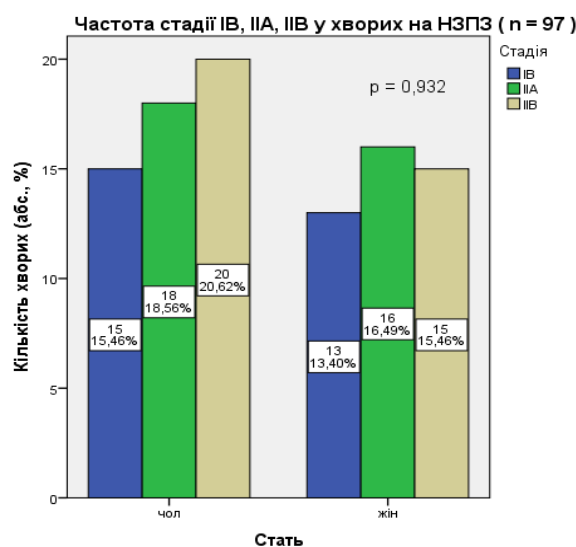


Рис. 2.6. Розподіл хворих за стадією згідно з TNM-7 залежно від статі.

При порівнянні розподілу хворих на НЗПЗ за стадіями ІВ, ІА та ІВ залежно від статі використовували критерій χ^2 . Отримано $\chi^2_{\text{факт.}}=0,14$, число ступенів вільності $k=2$. Різниця розподілу не є достовірною на рівні значущості, $p=0,932$. Таким чином, групи є репрезентативними за розподілом по стадіях ІВ, ІА та ІВ серед хворих на НЗПЗ чоловічої і жіночої статі.

Додатково було вивчено розподіл хворих за стадіями згідно з TNM-7 залежно від локалізації пухлини ПЗ в проксимальному та дистальному її відділах. При аналізі даних діаграми (рис. 2.7) розподілу хворих за стадією при локалізації солідної пухлини в головці ПЗ суттєвої відмінності не виявлено – стадію ІВ було встановлено в 22,68 % хворих, стадію ІА – в 25,77 % та стадію ІВ – в 23,71 %. Однак, у дистальному відділі ПЗ виявлено переважання частоти встановлення ІВ стадії порівняно з ІВ та ІА, у співвідношенні 12,37 %, 6,19 % та 9,28 % відповідно.

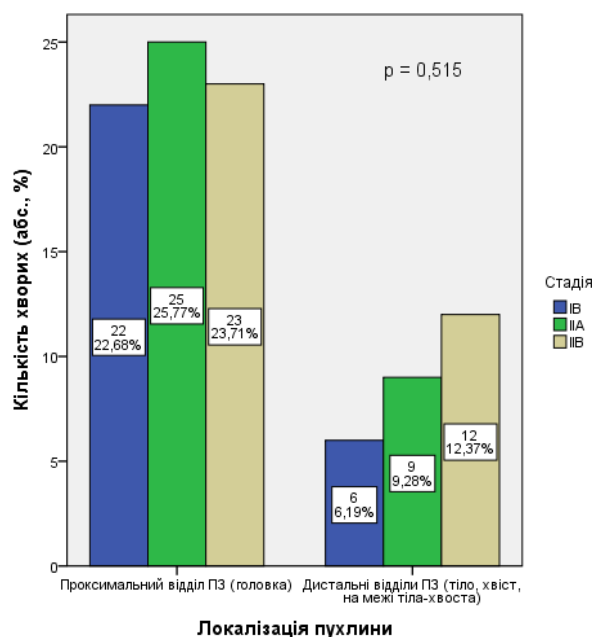


Рис. 2.7. Розподіл хворих на РПЗ за стадіями згідно з TNM-7 щодо проксимального та дистального відділів залози.

При порівнянні розподілу хворих на РПЗ за стадіями ІВ, ІА та ІВ залежно від локалізації пухлини в проксимальному чи дистальному її відділах використовували критерій χ^2 . Отримано $\chi^2_{\text{факт.}}=1,33$, число ступенів

вільності $k=2$. Різниця розподілу не є достовірною на рівні значущості, $p=0,515$. Отже, хворі з локалізацією пухлини в проксимальному відділі ПЗ (головка) є репрезентативними щодо хворих з локалізацією пухлини в дистальному її відділі (тіло, хвіст, на межі тіла-хвоста) за розподілом по стадіях ІВ, ІІА та ІІВ.

Таким чином, в дослідження в період 2010–2017 рр. було включено 97 хворих на РПЗ, середній вік яких склав $(60,4 \pm 1,1)$ роки (95 % ВІ: 58,3–62,6).

Переважали пацієнти з проксимальною локалізацією пухлини ПЗ (головка) 72,2 % (70 з 97); хворі з локалізацією пухлини в дистальних відділах ПЗ (тіло, хвіст, на межі тіла-хвоста) склали 27,8 % (27 з 97). Часка хворих чоловічої статі – 53 (54,6 %) була дещо вища ніж жіночої 44 (45,4 %). Частота встановлення ІІА та ІІВ стадії у хворих з резектабельним РПЗ суттєво не відрізнялась і становила 35 % (34 хворих з 97) та 36,1 % (35 хворих з 97) відповідно. У жодного хворого, включеного в дослідження, не встановлено ІА стадію, а ІВ стадія зустрічалась у 28,9 % випадків.

Статистично значущої різниці частоти розподілу хворих на РПЗ між групами порівняння (Р), (К+Р) та основною групою (Д+К+Р) за віком, статтю, локалізацією пухлини, стадією захворювання по TNM-7 не виявлено, $p>0,05$. Дослідні групи є репрезентативними, що дозволяє проводити в подальшому між ними порівняльний аналіз результатів лікування хворих на НЗПЗ.

2.3. Методи обстеження хворих

Обсяг діагностичних обстежень, схема лікування хворих на РПЗ та подальший диспансерний нагляд проводили відповідно до затвердженого МОЗ України від 17.09.2007 р. клінічного протоколу (додаток до наказу № 554), а також локального клінічного протоколу КМКЛ №10, в основу якого покладені рекомендації та клінічні протоколи ASCO (Американської

асоціації клінічних онкологів), ESMO (Європейської асоціації медичних онкологів), NCCN (Національної загальної онкологічної мережі США).

2.3.1. **Обов'язкові методи діагностики хворих груп порівняння (Р), (К+Р) та основної групи (Д+К+Р).** У всіх хворих, включених у дослідження в період 2010–2017 рр., як у групах порівняння (Р), (К+Р), так і основній групі (Д+К+Р) діагностичний алгоритм був побудований на принципі мультимодального підходу, етапності застосування методів діагностики та включав як стандартні методи клініко-лабораторної діагностики, так і спеціальні та додаткові.

Основним завданням на етапі передопераційної діагностики було визначення можливості виконання радикальної резекції ПЗ згідно з критеріями включення в дослідження. Для цього: встановлювали точну локалізацію солідної пухлини ПЗ відносно її відділів, визначали розміри пухлини; виключали наявність віддалених метастазів, канцероматозу очеревини, інвазію пухлини в магістральні судини.

У всіх хворих проводили збір скарг, анамнезу захворювання, анамнезу життя. При наявності синдрому механічної жовтяниці – уточнювали дату її першого виявлення та тривалість до звернення в клініку, чи супроводжувалась вона больовим синдромом.

У 100,0 % хворих на передопераційному етапі лабораторна діагностика включала: загальний аналіз крові з формулою, загальний аналіз сечі, цукру крові, біохімічний аналіз крові (білірубін та його фракції (кон'югований, некон'югований), креатинін, сечовина, альбумін, аланінамінотрансфераза, аспартатамінотрансфераза, лужна фосфатаза), коагулограма, електроліти плазми крові (K^+ , Na^+ , Cl^- , Ca^{2+}), активність α -амілази, визначення групи крові та Rh-фактора.

У всіх хворих, включених в дослідження, виконували ультразвукове дослідження органів черевної порожнини (УЗД ОЧП) та заочеревинного простору, рентгенографію ОЧП, знімали електрокардіограму в стандартних відведеннях.

Широко застосовували інструментальні методи діагностики: ЕФГДС, ЕРХПГ, ендоскопічну ультрасонографію (ЕУС), ФКС.

Гематологічну панель досліджень виконували на гематологічному аналізаторі АВХ Micros 60, виробництва фірми АВХ Diagnostics (Франція).

Досліджували онкомаркери СА 19-9 та РЕА методом імуноферментного аналізу (ІФА) на аналізаторі Тесан (Австрія).

УЗД ОЧП та заочеревинного простору (за необхідності застосовували режим дуплексного сканування судин) виконували на апараті Logiq α100, виробництва General Electric (США). ЕРХПГ здійснювали за допомогою фіброгастроуденоскопа з бічною оптикою Fujinon PS2-HS (Японія). ЕУС виконували ендоскопом з вбудованим конвексним УЗ датчиком – Pentax EG-3870УТК з УЗ робочою станцією – Hitachi Hi Vision 900.

Для отримання відповіді щодо точної локалізації, лінійних розмірів та розповсюдженості пухлини ПЗ в кожного хворого обов'язково застосовували один з методів променевої діагностики ОЧП та заочеревинного простору. Перевагу надавали МСКТ, МРТ доповнених МРПХГ (рис. 2.8). МСКТ та МРПХГ виконували з внутрішньовенним контрастуванням.



Рис. 2.8. МРПХГ (хвора, Т., 55 р.). ПАПЗ з локалізацією в головці ПЗ. На МР-скані відмічається обрив контрасту на рівні холедоха та головної панкреатичної протоки дистальніше пухлини.

МСКТ проводили на 40-зрізовому спіральному комп'ютерному томографі Siemens Somatom Sensation 40 SLICE, оснащеному рентгенівською трубкою Straton зі швидкістю 0,37 с на повний оберт Гентрі, ізотропне розрішення 0,4 мм, що забезпечене подвійною вибіркою Z-осі. При виконанні МСКТ застосовували болюсне контрастне підсилення «Візіпак-320». МРТ ОЧП з МРПХГ виконували на магнітно-резонансному томографі Siemens MAGNETOM Avanto 1,5 Тесла з внутрішньовенним введенням контрастної речовини «MultiHance», «Tomovist» (рис. 2.9).

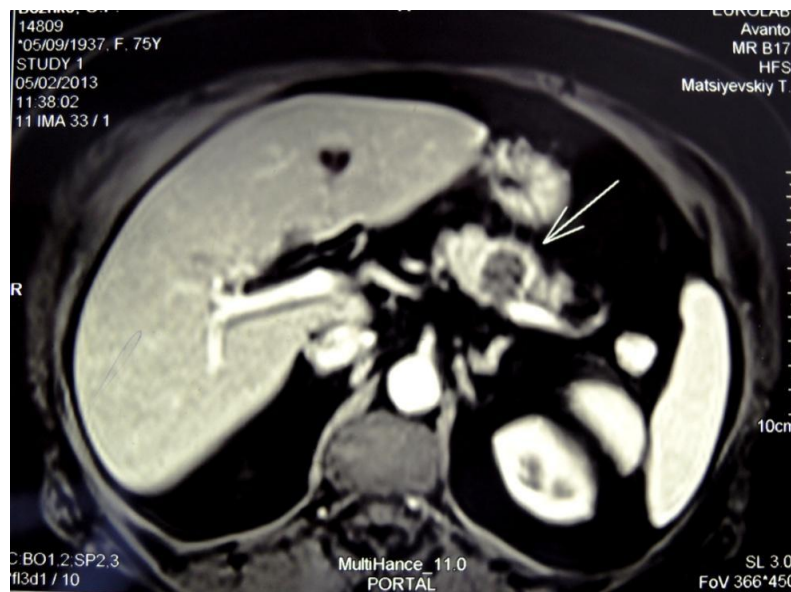


Рис. 2.9. МРТ ОЧП (хвора Б., 75 р.). На МР-скані в аксіальній площині візуалізується солідна пухлина тіла ПЗ.

Протокол МРТ дослідження включав характеристику інтенсивності МР-сигналу на T1-WI та T2-WI з використанням DWI – послідовностей. За даними МРТ, неопластичний процес з локалізацією як у проксимальному, так і в дистальному відділі ПЗ визначався, як утворення неправильної округлої форми, з нерівними контурами, характеризувався гіпоінтенсивним сигналом на T1-WI та ізо-, гіперінтенсивним на T2-WI щодо паренхіми залози. При довенному болюсному контрастуванні протокова карцинома ПЗ в артеріальну фазу зазвичай не підсилювалась; з помірним та гетерогенним підсиленням – у портально-венозну та віддалену фази. При використанні

DWI-послідовностей відмічався високий MP – сигнал (при $b=50$, $b=700$, $b=800$) з низьким коефіцієнтом обмеження дифузії на ADC-map, що означало високу клітинну щільність утворення та однозначно свідчило про малігнізацію процесу.

За даними КТ та МРТ-сканів в аксіальній та краніальній площинах вимірювали лінійні розміри пухлини (висоту, ширину, довжину) та визначали об'єм пухлини ($V_{п.}$, $см^3$) за формулою 2.1 [145]

$$V_{п.} = (a \times b \times c) \times K, \quad (2.1)$$

де $V_{п.}$ – об'єм пухлини; a – довжина пухлини; b – ширина пухлини; c – висота (глибина) пухлини; K – коефіцієнт Хігедіуса (стала, що становить 0,52).

У всіх хворих, включених у дослідження, діагноз ПАПЗ – підтверджували морфологічно. Гістологічне дослідження матеріалу пухлинної тканини ПЗ, лімфатичних вузлів, видаленого органоккомплекса, що надходив в патоморфологічне відділення з операційної, проводили рутинними класичними методами.

Отриманий матеріал фіксували в забуференому 10 % формаліні з рН 7,4 на одну годину, а потім проводили по спиртах: 96° спирт на 40 хв, 10 % розчин ізопропілового спирту на 110 хв, ущільнювали у парафіні 120 хв із застосуванням гістіопроектора Histos-5 («Milestone», Італія). З парафінових блоків виготовляли гістологічні зрізи товщиною 5 мкм за допомогою мікротома Microm HM325 (ThermoScientific, Німеччина).

Зрізи забарвлювали гематоксиліном і еозином для загальної оцінки пухлини за стандартною методикою.

Протокол патоморфологічного дослідження, видаленого інтраопераційно макропрепарата з солідною пухлиною ПЗ, включав:

- гістологічну верифікацію діагнозу зі стадіювання за pTNM;

– визначення ступеня диференціювання пухлини (G1 – високодиференційована, G2 – помірнодиференційована, G3 – низькодиференційована, G4 – недиференційована);

– дослідження чистоти краю резекції ПЗ (R0 – край резекції чистий, мікроскопічно пухлинні клітини не виявлені; R1 – по краю резекції мікроскопічно визначаються пухлинні клітини; R2 – мікроскопічно підтверджений макроскопічно нечистий край резекції).

Наведений методологічний діагностичний підхід було застосовано у всіх хворих як груп порівняння (P), (K+P), так і основної групи (D+K+P), включених у дослідження в період 2010–2017 рр.

Надалі буде наведено детальний опис додаткових та спеціальних методів діагностики, застосованих в окремих групах хворих відповідно до завдань на кожному з трьох етапів дослідження.

Так, на 1-му етапі дослідження (2010–2015 рр.) у пацієнтів групи порівняння (P), яким виконували лише класичний варіант резекції ПЗ, додатково застосовували цитологічний, ЦХХ методи при дослідженні ЦПК в крові, ППК в змивах з очеревини, метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в діагностиці KRAS-мутації та цпДНК в крові.

На 2-му етапі дослідження (2015–2016 рр.) в групі порівняння (K+P) інтраопераційно в режимі реального часу реєстрували динаміку змін температури в солідній резектабельній пухлині ПЗ на дискретних глибинах (3, 8, 13 та 18 мм) від робочої поверхні кріоаплікатора, під час кріофіксації. Термометрію проводили за допомогою мідь-константанових термопар Т-типу, встановлених в пухлину на глибину 3, 8, 13 та 18 мм від її поверхні. Також на даному етапі дослідження з метою подальшої якісної та кількісної оцінки морфологічних змін у пухлинній тканині на глибинах вимірювання температури (3, 8, 13, 18 мм) застосовували додатково до стандартних методик спеціальний метод – гістоморфометрію. Виготовлені за класичною методикою гістологічні мікропрепарати фотографували за допомогою мікроскопа OLYMPUS CX 41 з вбудованою камерою; фото мікропрепарату

пухлини завантажували в програму Quick PHOTO MICRO 2.3, за допомогою якої проводили розрахунок відсотка життєздатних ПК в препараті (життєздатні ПК – позначали фазою синього кольору; ПК з ознаками необоротних деструктивних змін унаслідок первинного кріопшкодження – фазою червоного кольору).

На 3-му етапі дослідження (2016–2017 рр.) в основній групі (Д+К+Р) в пухлину ПЗ за 5 хв до проведення кріофіксації вводили дистильовану H_2O за розробленою формулою 2.2 в експериментальній частині роботи

$$V_{д.в.} = V_{п.} * 0,38, \quad (2.2)$$

де $V_{д.в.}$ – об'єм пухлини; $V_{п.}$ – об'єм пухлини; 0,38 – коефіцієнт (розраховано експериментально).

Реєстрацію динаміки змін температури в пухлині ПЗ на дискретних глибинах (3, 8, 13, 18 мм) здійснювали розробленим КВІТ-4, як і в 2-му етапі дослідження шляхом встановлення мідь-константанових термопар.

2.4. Методика термометрії процесу кріофіксації в біологічній тканині на дискретних глибинах

Кафедрою загальної хірургії №1 Національного медичного університету імені О.О. Богомольця в 2015 р. сумісно з НВФ «Пульс» (м. Київ, Україна) було розроблено спосіб термометрії на дискретних глибинах в біологічній тканині шляхом застосування чотирьох термопар Т-типу фіксованої довжини (3, 8, 13 та 18 мм), фіксованих в кільцевому тримачі термопар, що лягло в основу застосування комплексу вимірювального інтраопераційного термопарного чотириканального (КВІТ-4), що представлено на рисунку 2.10 [18]. При розробці даного комплексу нами було проведено аналіз літератури та пошук аналогу [2] і прототипу [32], усунуто недоліки останніх. КВІТ-4 призначений для температурного контролю зони охолодження аплікаторами з комплекту установки кріохірургічної універсальної «Кріо-Пульс». Розробляли його шляхом

застосування спеціального кільцевого тримача термопар внутрішнім діаметром 30 мм з фторопласту марки Ф-4 як під плоскі, так і сферичні кріоаплікатори діаметром від 5 до 30 мм з комплекту універсальної кріохірургічної установки «Кріо-Пульс», оснащеного чотирма голками діаметром 1 мм з фіксованою довжиною 3, 8, 13, 18 мм.



Рис. 2.10. Комплекс вимірювальний інтраопераційний термопарний чотириканальний (КВІТ-4) (патент України на корисну модель 116730).

Тримач термопар – це кільце із закріпленими по колу через 90° чотирма термозондами з вбудованими термопарами. Креслення зрізу тримача термопар в горизонтальній та сагітальній площинах (рис. 2.11).

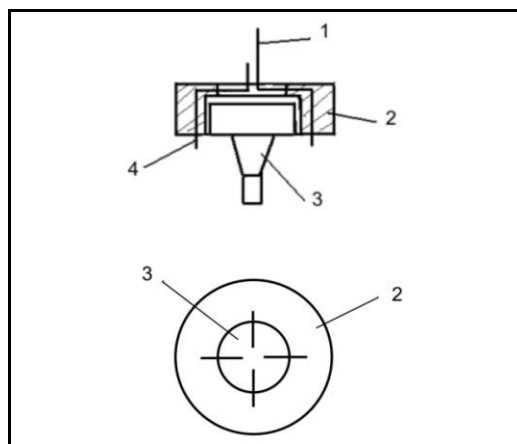


Рис. 2.11. Схема тримача термопар КВІТ-4: 1 – термозонд; 2 – кільцевий тримач термозонда; 3 – кріоаплікатор; 4 – виводи термопар термозонда.

Габаритні розміри тримачів термопар: при зовнішньо – внутрішньому діаметрі 50/31 мм; максимальна висота фіксатора з виведеними термопарами – 50 мм. Тримач термопар є універсальним як під плоскі, так і сферичні кріоаплікатори діаметром від 5 до 30 мм. Тримач термопар виготовлений з фторопласту марки Ф-4 (збірне кільце) з чотирма вбудованими мідь-константановими термопарами Т-типу. Робочі кінці термопар виведені у вигляді голок діаметром 1 мм з різною відстанню від робочої поверхні застосованого кріоаплікатора: 3, 8, 13 і 18 мм. Термопари розташовували в зоні центру тримача термопар на відстані 5 мм одна від одної. Ці відстані є контрольними для вимірювання температури в зоні тканини, яку заморожують від робочої поверхні кріоаплікатора.

Виводи термопар мають довжину 2 м і кожна пара виводів ізольована силіконовою трубкою (Elastosil R 401), на кінці яких розміщена полярна вилка для підключення до вимірювальних приладів. Термопари мають кольорове маркування (синій колір для Т-типу) згідно зі стандартом Північноамериканського національного інституту стандартів (ANSI). Комплекс КВІТ-4 дозволяє вимірювати температуру від $-200\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $+60\text{ }^{\circ}\text{C}$, одночасно реєструючи показники з 4-х термопар.

Комплекс КВІТ-4 оснащується двома двоканальними цифровими термометрами серії UT-325, що мають вбудовану функцію запису температури, що вимірюють, для вибраного типу термопари (є можливість роботи з термопарами типу J, K, T, E, R, S, N). У комплекті з інструкцією користувача – міні-диск з програмним забезпеченням для виводу величин, що вимірюються, у графічному режимі на монітор персонального комп'ютера через кабель USB. Діапазон вимірювань для термопари Т-типу: від $-200\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $+400\text{ }^{\circ}\text{C}$. Точність вимірювань для термопари Т-типу: $\pm (0,2\% + 0...6\text{ }^{\circ}\text{C})$. Інші технічні характеристики наведені в інструкції з експлуатації приладу. Прилад UT-325 має сертифікат ЄС, безпека відповідає стандартам EN61326:2006, EN55022:2006 і EM55024:1998+A1+A2. Живлення: батарея 9 V (NEDA 1604 або 6F22 або 006P). У 2015 році проведено державну метрологічну атестацію КВІТ-4 (свідоцтво 24.440.12 ДП «Укрметртестстандарт» від 31 грудня 2015 р.), [43].

Комплекс вимірювальний інтраопераційний термопарний чотириканальний (КВІТ-4) – це дослідний зразок, який призначений для температурного контролю зони охолодження біологічної тканини аплікаторами з комплексу установки кріохірургічної універсальної «Кріо-Пульс» (виробник НВФ «Пульс», Київ, Україна), і є додатковим інструментом контролю процесу кріодії на біологічну тканину.

Таким чином, розробка та впровадження в клінічну практику КВІТ-4 дозволила нам отримати додатковий інструмент інтраопераційного контролю ефективності проведення кріофіксації солідної пухлини ПЗ шляхом реєстрації температури на дискретних глибинах (3, 8, 13 та 18 мм) від робочої поверхні кріоаплікатора. Технічні характеристики КВІТ-4, а саме – довжина найдовшої термопари, що становить 18 мм, – дозволили застосувати даний прилад при виконанні експериментальної частини дослідження на моделях *in vitro* та *in vivo* при розробці методу кріопотенціювання [22].

Методи статистичної обробки даних

Статистичну обробку даних проводили за допомогою програмного забезпечення IBM SPSS Statistics 22.0 та пакету MedStat [37]. При обробці експериментальних та клінічних даних проводили тест на нормальність розподілу. У випадку, коли закон розподілу дослідної величини не відрізнявся від нормального, то ми застосовували параметричні статистичні методи, в протилежному випадку застосовували непараметричні методи аналізу. Результати реєстрації температур по показниках термопар Т1-4 КВІТ-4 представляли у вигляді середнього значення (M) та похибки середнього значення (m) у вигляді графіків-термограм. Достовірність різниці між порівнюваними величинами вважали при $p < 0,05$. Застосовували критерій χ^2 , ранговий однофакторний аналіз Крускала-Уолліса, метод кутового перетворення Фішера, проводили дисперсійний аналіз методом множинних порівнянь Шеффе. Вживаність хворих груп порівняння (P), (K+P) та основної групи (D+K+P) оцінювали методом Kaplan-Meier в пакеті IBM SPSS 22.0 з побудовою кривих кумулятивної виживаності.

Основні положення розділу 2 показано в працях автора [18], [22].

РОЗДІЛ 3

ПОТЕНЦІЮВАННЯ ВПЛИВУ НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР НА ПУХЛИННУ ТКАНИНУ (ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)

3.1. Матеріали та методи експериментальних досліджень

Метою експериментального дослідження була розробка ефективного методу потенціювання локальної кріодії на солідну злоякісну пухлину. Дослідження виконувались на базі Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України (м. Київ) в червні – серпні 2016 р. у чотири етапи.

На першому етапі експериментальної частини дослідження вивчали динаміку змін температури на дискретних глибинах, розмірів (висота, діаметр) та об'єму льодяної кулі (*ice-ball*) у гіпотонічному (дистильована H_2O), фізіологічному (0,9 % NaCl) та насиченому гіпертонічному (36 % NaCl) розчині під час локальної кріодії.

Для заморозки використовували установку кріохірургічну універсальну «Кріо - Пульс», виробництва ТОВ НВФ «Пульс» (м. Київ). Температура на робочій поверхні кріоаплікатора установки складала $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$; в дослідженні застосовували кріоаплікатор діаметром 20 мм; час експозиції кріодії – 10 хв. Температуру в розчинах під час формування льодяної кулі на дискретних глибинах від поверхні кріоаплікатора реєстрували в режимі реального часу за допомогою комплексу вимірювального інтраопераційного термопарного чотириканального (КВІТ-4). В КВІТ-4 виведено 4 термопари (Т), вбудовані в голки однакового діаметру та різної довжини: Т1 довжиною 3 мм, Т2 – 8 мм, Т3 – 13 мм та Т4 – 18 мм. Діаметр та висоту сформованої льодяної кулі в кінці 10-ї хв. заморозки вимірювали за допомогою штангельциркуля.

Лабораторні градуйовані стакани (ГОСТ 25 336-82, Україна) ємністю 250 мл заповнювали до відмітки 200 мл: розчином 0,9 % NaCl, другий ідентичний стакан – 36 % NaCl, третій стакан – дистильованою H_2O .

За 2 год до початку експерименту дослідні рідини поміщали в термостат та підігрівали до 37 °С. Температура в лабораторії під час проведення експерименту постійно підтримувалась за допомогою кондиціонера Cooper&Hunter на рівні 21 °С.

До кріоаплікатора щільно фіксували тримач термопар КВІТ-4. Кріозонд фіксували в штативі таким чином, щоб всі чотири термопарі довжиною 3, 8, 13 та 18 мм під кутом 90° були занурені в розчин, що піддавався заморожуванню, а сам кріоаплікатор знаходився в безпосередньому контакті з цим розчином всією площею своєї робочої поверхні, будучи зануреним в нього на 2 мм (рис. 3.1). Такий методологічний підхід було застосовано поетапно з розчином 0,9 % NaCl, дистильованою H₂O та 36 % NaCl та повторено тричі. Фото та відеофіксацію етапів експерименту проводили камерою Nikon COOLPIX P310.

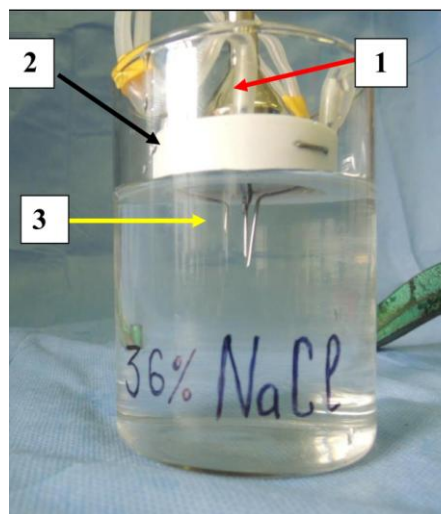


Рис. 3.1. Фіксований в штативі кріозонд апарата «Кріо-Пульс»: 1 – кріоаплікатор діаметром 20 мм; 2 – тримач термопар КВІТ-4; 3 – термопарі Т1 (3 мм), Т2 (8 мм), Т3 (13 мм) та Т4 (18 мм), що занурені в розчин 36 % NaCl.

Завданням другого етапу експериментального дослідження було вивчення морфологічних змін у пухлинних клітинах при контакті їх суспензії з дистильованою H₂O та отримання відповіді щодо необхідної мінімальної

тривалості часу експозиції, достатньої для розвитку максимальної їх гідратації за рахунок осмосу.

В якості експериментальної моделі обрано карциному Герена. Карцинома Герена (синонім пухлина T8) – це штам перещеплюваного низькодиференційованого раку щурів, отриманого зі спонтанної аденокарциноми матки щурів ще в 1934 р. Пухлинний штам карциноми Герена було отримано з «Клітинного банку ліній з тканин людини та тварин» ІЕПОР імені Р. Є. Кавецького НАН України.

Для перещеплення карциноми було обрано білих безпородних щурів-самок масою 110–140 г, взятих з акредитованого віварію ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Всі щури утримувались в однакових умовах віварію, зі стандартним раціоном харчування і природним циклом освітлення день/ніч. Карциному Герена перещеплювали щурам за стандартною методикою шляхом підшкірного введення 0,5 мл 20 % суспензії пухлинних клітин в бік біля задньої лапки.

На 10–12 добу після перещеплення, при досягненні розмірів пухлини не менше 2 см в діаметрі (рис. 3.2), вводили щура в наркоз шляхом внутрішньоочеревинного введення 1 % розчину тіопенталу натрію в дозі 1,5 мг на 100 г маси тіла. Після цього проводили фіксацію дослідного щура на парафіновій дощечці, розсікали шкіру над пухлиною, мобілізували останню по передньо-бокових поверхнях та видаляли карциному Герена (рис. 3.3).

Видалену пухлину (рис. 3.4) гомогенізували, 1 мл суспензії пухлинних клітин поміщали в чашку Петрі та додавали 10 мл 0,9 % NaCl (контроль), в іншу чашку Петрі до 1 мл суспензії пухлинних клітин додавали 10 мл дистильованої H_2O , фіксували час початку контакту пухлинних клітин з дистильованою H_2O .

В якості дистильованої H_2O застосовували стерильну «Воду для ін'єкцій», яка виготовляється шляхом обов'язкової дистиляції ПрАТ

«Фармацевтична фірма «Дарниця»» (м. Київ, Україна) та внесена в Державну Фармакопею України [9].



Рис. 3.2. Карцинома Герена на 10-ту добу після пере щеплювання.



Рис. 3.3. Етап мобілізації пухлини в лабораторного щура.

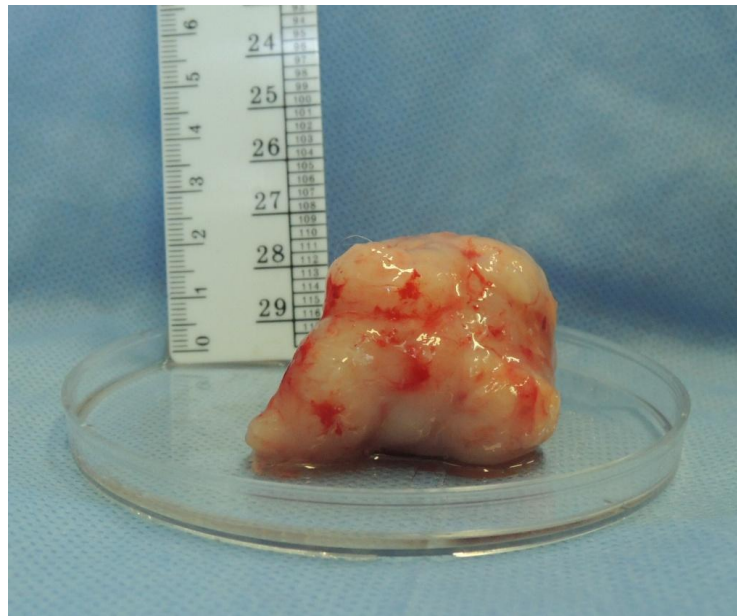


Рис. 3.4. Вигляд видаленої у лабораторного щура карциноми Герена на 10-ту добу після перещеплення (етап підготовки до гомогенізації).

Для аналізу морфологічних змін та оцінки морфометричних даних в клітинах карциноми готували цитологічні препарати. З чашки Петрі, в яку до пухлинних клітин додавали 0,9 % NaCl, стерильною піпеткою забирали 0,1 мл суспензії та наносили її тонким шаром на предметне скло. На 5-ту, 10-ту та 15-ту хв від початку контакту пухлинних клітин з дистильованою H_2O з іншої чашки Петрі ідентичним способом стерильною піпеткою також забирали 0,1 мл суспензії та наносили на предметне скло тонким шаром.

Подальша підготовка цитологічних препаратів проводилась за стандартною методикою шляхом етапного виконання висушування, фіксації та забарвлення матеріалу на предметних скельцях.

Після висушування на повітрі, препарати фіксували в Азур-Еозині протягом 3 хв з подальшим забарвленням за Романовським 10 хв, та висушували на повітрі.

Дослідження проводились на мікроскопі Olympus CX – 21 (Японія), оптична система UIS 2, об'єктиви план-ахромат С 10х, 20х, 40х, 100х oil і Leica Microsystems DM E (Німеччина), об'єктив С-Plan 4х, 10х, 20х, 100х oil.

Мікрофотографії виконували за допомогою фотонасадки Sony DSC-N10 на збільшенні 40х та 100х за допомогою імерсійного масла RAL Diagnostics (Франція). Обробку і вимірювання проводили за допомогою операційної системи Windows 7 (x64) та програмного забезпечення для дослідження та обробки цифрових зображень, а також для проведення вимірювань (ручного і автоматичного) – Altami Studio 3.4.0.

Метою третього етапу експериментального дослідження було отримання відповіді на запитання, чи посилює процес локальної кріодії попереднє введення дистильованої H_2O в біологічну тканину за відсутності кровотоку.

В якості експериментальної моделі було обрано паренхіматозний орган – печінку свині. Було сформовано дві групи дослідних зразків печінки: групу порівняння (ГП) та основну (ОГ). В кожну групу включено по 3 дослідних зразки. Середня маса печінки складала ($1553 \pm 65,3$) г. Локальну кріодію без додаткових маніпуляцій проводили в ГП; в ОГ – попередньо вводили 20 мл дистильованої H_2O в паренхіму печінки, в ділянці запланованої локальної кріодії, через 5 хв після введення проводили локальний кріовплив. Динаміку змін температури в печінці на дискретних глибинах (3, 8, 13 та 18 мм) від робочої поверхні кріоаплікатора визначали за допомогою комплексу вимірювального термопарного чотириканального (КВІТ-4). Процес низькотемпературного локального кріовпливу здійснювали універсальною

кріохірургічною установкою «Кріо-Пульс»). Застосовували кріоаплікатор з діаметром робочої поверхні 20 мм та температурою -180°C , час експозиції кріовпливу складав 10 хв. Кріодеструкцію виконували подвійним циклом з наступним спонтанним відтаванням після завершення 10-ї хв кріовпливу кожного циклу заморозки як в поєднанні з кріопотенціюванням дистильованою H_2O , так і без.

Вилучену в день експерименту печінку свині підігрівали в термостаті до температури 37°C та укладали на лабораторний стіл.

До кріоаплікатора (3) щільно фіксували тримач термопар (2) КВІТ-4 (4). Кріозонд фіксували в штативі таким чином, щоб всі чотири термопари (3, 8, 13, 18 мм) КВІТ-4 були введені під кутом 90° (по відношенню до поверхні Глісонової капсули) в праву латеральну долю печінки свині (1). 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.

В якості дистильованої H_2O застосовували стерильну «Воду для ін'єкцій», виготовлену шляхом обов'язкової дистиляції ПрАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця» (м. Київ, Україна) та внесену в Державну фармакопею України [9].

Статистичну обробку даних проводили за допомогою програмного забезпечення IBM SPSS Statistics 22. Результати реєстрації температур в ГП ($n=3$) та ОГ ($n=3$) по показниках термопар Т1, Т2, Т3 та Т4 КВІТ-4 представляли у вигляді середнього значення (М) та похибки середнього значення (m).

Метою четвертого етапу експериментального дослідження було отримання відповіді на запитання, чи посилює попереднє введення дистильованої H_2O в солідну пухлину процес локальної кріодії за збереженого кровотоку.

В якості експериментальної моделі було обрано карциному Герена, перещеплену білим безпородним щурам. Було використано 40 білих

безпородних щурів-самок масою 110–140 г, взятих з акредитованого віварію ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Всі щури утримувались у віварії в однакових умовах зі стандартним раціоном харчування і природним циклом освітлення день/ніч. Карциному Герена перещеплювали під шкіру задньо-бокової поверхні тулуба щура. Методика перещеплення не відрзнялась від описаної в підрозділі 3.2.

Важливим критерієм включення в дослідження щурів була висота пухлини, яка мала складати до 12-ї доби після перевивання не менше 20 мм, що дозволяло проводити термометрію КВІТ-4, оскільки четверта термопара комплексу дає змогу отримувати температурні дані в найбільш віддаленій точці від поверхні кріоаплікатора – на глибині 18 мм.

3.2. Результати дослідження процесу локальної кріодії на експериментальних моделях розчинів 0,9 % NaCl, 36 % NaCl та дистильованої H₂O

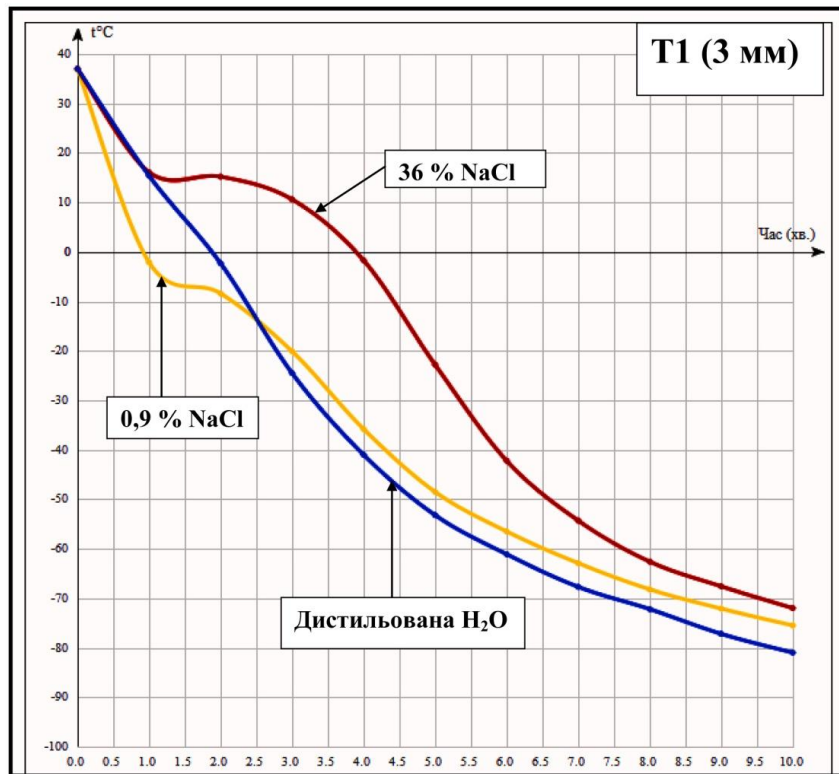
Завданням першого етапу було визначення динаміки змін температури на дискретних глибинах, розмірів (висота, діаметр) та об'єму льодяної кулі (*ice-ball*) у гіпотонічному (дистильована H₂O), фізіологічному (0,9 % NaCl) та насиченому гіпертонічному (36 % NaCl) розчині під час локальної кріодії.

Значення зниження температури (t °C) під час локальної кріодії з тривалістю періоду заморозки 10 хв на дискретних глибинах (3, 8, 13 та 18 мм) від робочої поверхні кріоаплікатора діаметром 20 мм в дослідних розчинах 0,9 % NaCl, дистильованій H₂O та 36 % NaCl за показниками термопар Т1 – 4 КВІТ-4 представлено в таблиці 3.1 у вигляді середнього значення (M) та похибки середнього (m). Для зручності візуального сприйняття даних побудовано графіки динаміки зниження температур по кожній окремо взятій термопарі (Т1–4) КВІТ-4 в дослідних рідинах (0,9 % NaCl, 36 % NaCl, дистильована H₂O) у вигляді термограм, що представлено на рисунках 3.5, 3.6

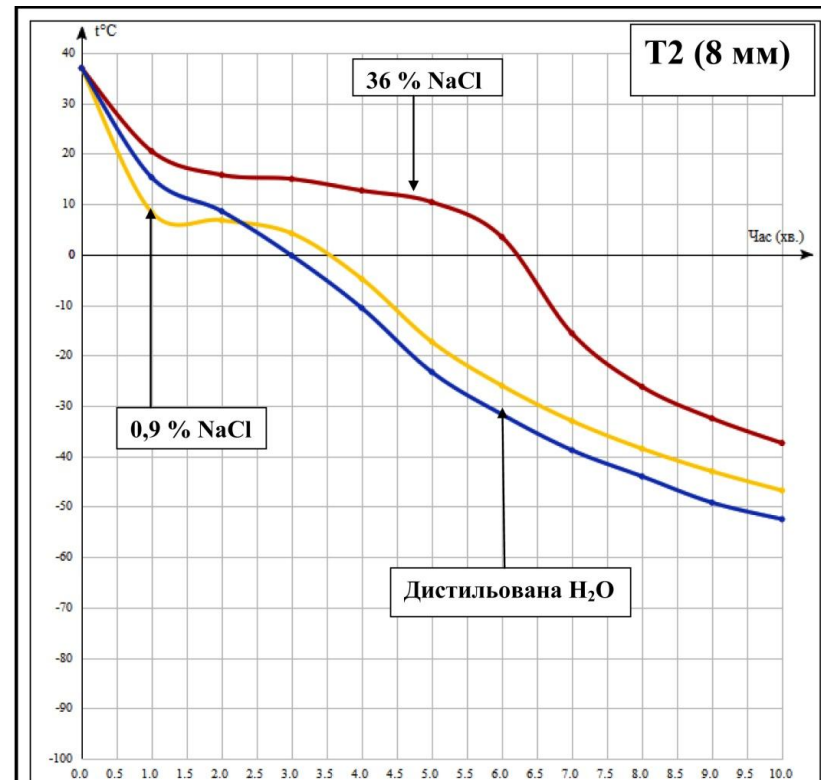
Таблиця 3.1

**Динаміка зниження температур на дискретних глибинах
в льодяній кулі 3, 8, 13 та 18 мм від робочої поверхні кріоаплікатора Ø 20 мм за 10 хв кріодії
за показниками термопар Т1, Т2, Т3 та Т4 в розчинах 0,9 % NaCl, дистильованій H₂O та 36 % NaCl**

| Час, хв | 0,9 % NaCl | | | | Дистильована H ₂ O | | | | 36 % NaCl | | | |
|------------|--------------|--------------|---------------|---------------|-------------------------------|--------------|---------------|---------------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| | T1 (3 мм) | T2 (8 мм) | T3 (13 мм) | T4 (18 мм) | T1 (3 мм) | T2 (8 мм) | T3 (13 мм) | T4 (18 мм) | T1 (3 мм) | T2 (8 мм) | T3 (13 мм) | T4 (18 мм) |
| 0 | 37,0 | 37,0 | 37,0 | 37,0 | 37,0 | 37,0 | 37,0 | 37,0 | 37,0 | 37,0 | 37,0 | 37,0 |
| 1 | -2,4 (0,2) | 8,4 (0,2) | 16,7 (0,3) | 21,5 (0,8) | 12,9 (0,8) | 14,7 (0,8) | 16,9 (1,4) | 18,9 (0,4) | 16,7 (0,3) | 20,9 (0,3) | 22,5 (0,7) | 23,4 (0,5) |
| 2 | -8,1 (0,1) | 7,1 (0,2) | 13,5 (0,6) | 18,2 (0,3) | -3,9 (0,9) | 10,0 (1,9) | 13,1 (0,8) | 14,4 (0,7) | 14,8 (0,2) | 17,1 (1,6) | 20,5 (0,3) | 22,6 (0,1) |
| 3 | -19,3 (0,4) | 4,4 (0,1) | 10,9 (0,6) | 14,5 (0,7) | -25,0 (0,3) | -1,6 (0,7) | 7,0 (0,08) | 9,2 (0,1) | 10,5 (0,3) | 13,7 (0,3) | 16,4 (0,1) | 18,7 (0,5) |
| 4 | -35,2 (0,4) | -4,9 (0,5) | 6,3 (0,2) | 12,4 (0,3) | -42,8 (0,9) | -12,1 (0,8) | 3,3 (0,2) | 6,0 (0,4) | -2,1 (0,2) | 12,3 (0,4) | 14,1 (0,2) | 14,5 (0,2) |
| 5 | -46,2 (1,1) | -16,6 (0,3) | 1,7 (0,6) | 9,8 (0,4) | -54,5 (0,7) | -24 (0,4) | -4,1 (0,3) | 3,1 (0,08) | -21,2 (0,8) | 9,5 (0,6) | 10,2 (0,3) | 11,6 (0,2) |
| 6 | -55,6 (0,5) | -25,5 (0,4) | -4,0 (0,4) | 7,1 (0,4) | -64,4 (1,7) | -32,6 (0,5) | -11,6 (0,4) | 0,3 (0,2) | -37,9 (0,3) | 3,9 (0,3) | 8,3 (0,2) | 9,2 (0,2) |
| 7 | -62,2 (0,4) | -32,7 (0,6) | -9,7 (0,3) | 4,5 (0,2) | -69,3 (0,8) | -39,5 (0,4) | -18,9 (0,5) | -2,0 (0,1) | -51,0 (0,7) | -14,5 (0,8) | 4,6 (0,5) | 8,0 (0,4) |
| 8 | -67,3 (0,6) | -37,7 (0,5) | -16,6 (0,5) | -1,2 (0,3) | -74,5 (0,7) | -44,5 (0,3) | -25,2 (0,9) | -5,3 (0,3) | -61,3 (0,7) | -24,8 (0,7) | 2,0 (0,3) | 5,2 (0,9) |
| 9 | -72,5 (0,4) | -42,5 (0,3) | -21,0 (0,4) | -4,6 (0,3) | -78,2 (0,5) | -49,6 (0,2) | -29,4 (0,8) | -9,4 (0,5) | -66,3 (0,7) | -32,0 (0,3) | 0,6 (0,1) | 2,2 (0,6) |
| 10 | -74,7 (0,5) | -45,9 (0,4) | -24,9 (0,5) | -8,3 (0,1) | -84,5 (0,7) | -54,1 (0,8) | -35,1 (0,7) | -14,4 (0,5) | -70,7 (0,6) | -36,5 (0,4) | 0,3 (0,1) | 0,9 (0,3) |



А

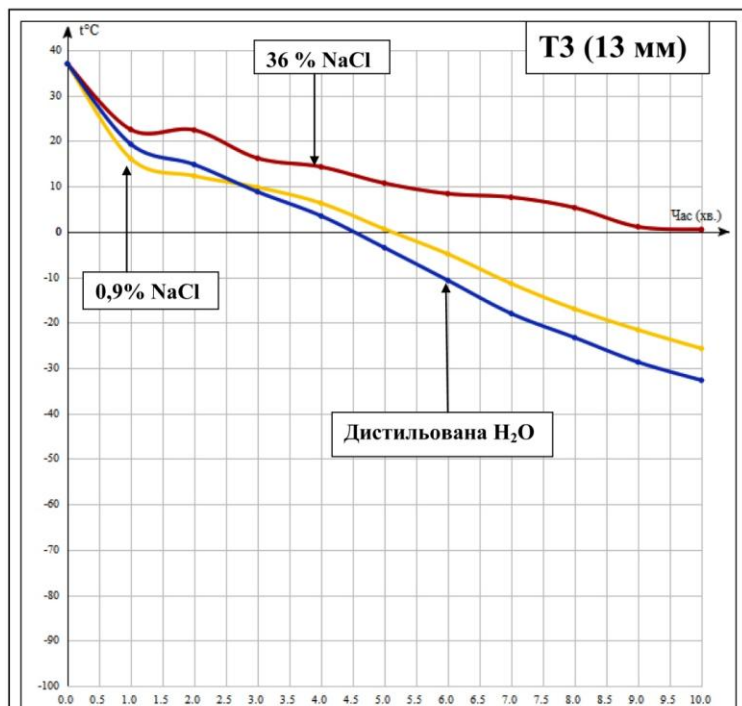


Б

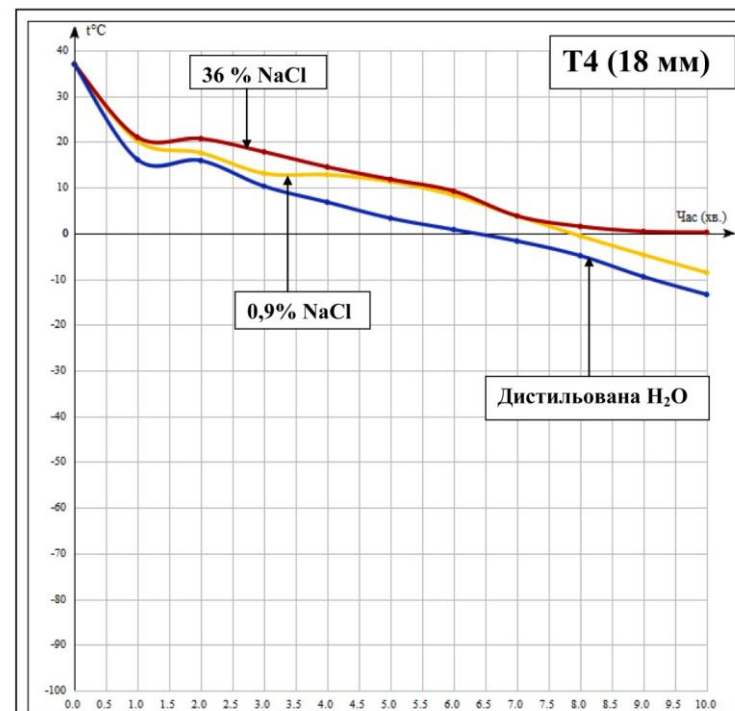
Рис. 3.5. Графічне зображення динаміки зниження температури за показником термопарі (в розчині 0,9 % NaCl – крива жовтого кольору —, дистильованій H_2O – крива синього кольору — та розчині 36 % NaCl – крива червоного кольору —):

А – T1 на глибині 3 мм від поверхні кріоаплікатора;

Б – T2 на глибині 8 мм від поверхні кріоаплікатора



А



Б

Рис. 3.6. Графічне зображення динаміки зниження температури за показником термопарі (в розчині 0,9 % NaCl – крива жовтого кольору —, дистильованій H₂O – крива синього кольору — та розчині 36 % NaCl – крива червоного кольору —):

А – Т3 на глибині 13 мм від поверхні кріоаплікатора;

Б – Т4 на глибині 18 мм від поверхні кріоаплікатора.

Стежачи за ходом термограми червоного кольору (див. рис. 3.6), можна відзначити, що з 1-ї та до 10-ї хв включно на відстані 13 мм та 18 мм від робочої поверхні кріоаплікатора в розчині 36 % NaCl не досягаються середні температури в діапазоні мінусових значень і в кінці 10-ї хв локальної кріодії складають лише $(0,3 \pm 0,1)$ та $(0,9 \pm 0,3)$ °C відповідно.

Порівняльний аналіз значень різниці між вихідною температурою дослідного розчину (37 °C) та досягнутою середньою температурою вкінці 10-ї хвилини кріодії в дослідних рідинах (0,9 % NaCl, дистильована H₂O та 36 % NaCl) по кожній з чотирьох термопар (Т1–4) представлено в таблиці 3.2 у вигляді $\Delta t_{\text{сер.}}$ (°C).

Таблиця 3.2

Порівняльний аналіз значень різниці зниження $\Delta t_{\text{сер.}}$ (°C) в кінці 10-ї хв локальної кріодії за показниками термопар КВІТ-4 в розчині 0,9 % NaCl, дистильованій H₂O та 36 % NaCl на глибині 3, 8, 13, 18 мм від робочої поверхні кріоаплікатора Ø 20 мм

| Термо-пара | На скільки $\Delta t_{\text{сер.}}$ (°C) знизилась в розчині з 1-ї до 10-ї хв ($M \pm \sigma$) | | | На скільки % ($\Delta t_{\text{сер.}}$, °C) в дистильованій H ₂ O більше | | <i>p</i> |
|---------------|--|------------------|-------------------------------|---|-------------|----------|
| | 0,9 % NaCl | 36 % NaCl | дистильована H ₂ O | в 0,9 % NaCl | в 36 % NaCl | |
| Т1 (3 мм) | $111,7 \pm 0,5$ | $107,7 \pm 0,67$ | $121,5 \pm 0,73$ | 8,7 | 12,8 | < 0,001 |
| Т2 (8 мм) | $82,9 \pm 0,42$ | $73,5 \pm 0,45$ | $91,1 \pm 0,83$ | 9,8 | 23,9 | < 0,001 |
| Т3 (13 мм) | $61,9 \pm 0,46$ | $36,7 \pm 0,13$ | $72,1 \pm 0,7$ | 16,5 | 96,4 | < 0,001 |
| Т4 (18 мм) | $45,3 \pm 0,14$ | $36,1 \pm 0,3$ | $51,4 \pm 0,5$ | 13,5 | 42,3 | < 0,001 |

Примітка. $p < 0,001$ – достовірність різниці $\Delta t_{\text{сер.}}$ між розчином 0,9 % NaCl, 36 % NaCl та в дистильованій H₂O (дисперсійний аналіз методом множинних порівнянь Шеффе).

Достовірність різниці між вихідною середньою температурою (37 °С) дослідного розчину та досягнутою середньою температурою в кінці 10-ї хв криодії в дослідних рідинах (0,9 % NaCl, дистильована H₂O та 36 % NaCl) за показниками кожної окремо взятої термопари (Т1–4) визначали шляхом проведення дисперсійного аналізу методом множинних порівнянь Шеффе.

Так, для термопари Т1 (3 мм) встановлено: різниця $\Delta t_{\text{сер.}}$ (°С) в 0,9 % NaCl та 36 % NaCl є статистично достовірною на рівні значущості $p=0,01$ ($F=9,52$); різниця $\Delta t_{\text{сер.}}$ (°С) в 0,9 % NaCl та дистильованій H₂O є статистично достовірною на рівні значущості $p < 0,01$ ($F=58,09$); різниця $\Delta t_{\text{сер.}}$ (°С) в 36 % NaCl та дистильованій H₂O є статистично достовірною на рівні значущості $p < 0,01$ ($F=114,6$).

Для термопари Т2 (8 мм) встановлено: різниця $\Delta t_{\text{сер.}}$ (°С) в 0,9 % NaCl та 36 % NaCl є статистично достовірною на рівні значущості $p<0,01$ ($F=61,98$); різниця $\Delta t_{\text{сер.}}$ (°С) в 0,9 % NaCl та дистильованій H₂O є статистично достовірною на рівні значущості $p<0,01$ ($F=45,075$); різниця $\Delta t_{\text{сер.}}$ (°С) в 36 % NaCl та дистильованій H₂O є статистично достовірною на рівні значущості $p<0,01$ ($F=214,20$).

Для термопари Т3 (13 мм) встановлено: різниця $\Delta t_{\text{сер.}}$ (°С) в 0,9 % NaCl та 36 % NaCl є статистично достовірною на рівні значущості $p<0,01$ ($F=114,10$); різниця $\Delta t_{\text{сер.}}$ (°С) в 0,9 % NaCl та дистильованій H₂O є статистично достовірною на рівні значущості $p<0,01$ ($F=101,30$); різниця $\Delta t_{\text{сер.}}$ (°С) в 36 % NaCl та дистильованій H₂O є статистично достовірною на рівні значущості $p<0,01$ ($F=1214,00$).

Для термопари Т4 (18 мм) встановлено: різниця $\Delta t_{\text{сер.}}$ (°С) в 0,9 % NaCl та 36 % NaCl є статистично достовірною на рівні значущості $p<0,01$ ($F=174,30$); різниця $\Delta t_{\text{сер.}}$ (°С) в 0,9 % NaCl та дистильованій H₂O є статистично достовірною на рівні значущості $p<0,01$ ($F=73,35$); різниця $\Delta t_{\text{сер.}}$ (°С) в 36 % NaCl та дистильованій H₂O є статистично достовірною на рівні значущості $p<0,01$ ($F=473,70$).

Після закінчення 10-ї хв кріодії сформований *ice-ball* у всіх трьох розчинах мав вигляд геометричної фігури – кульового сегмента (рис. 3.7).

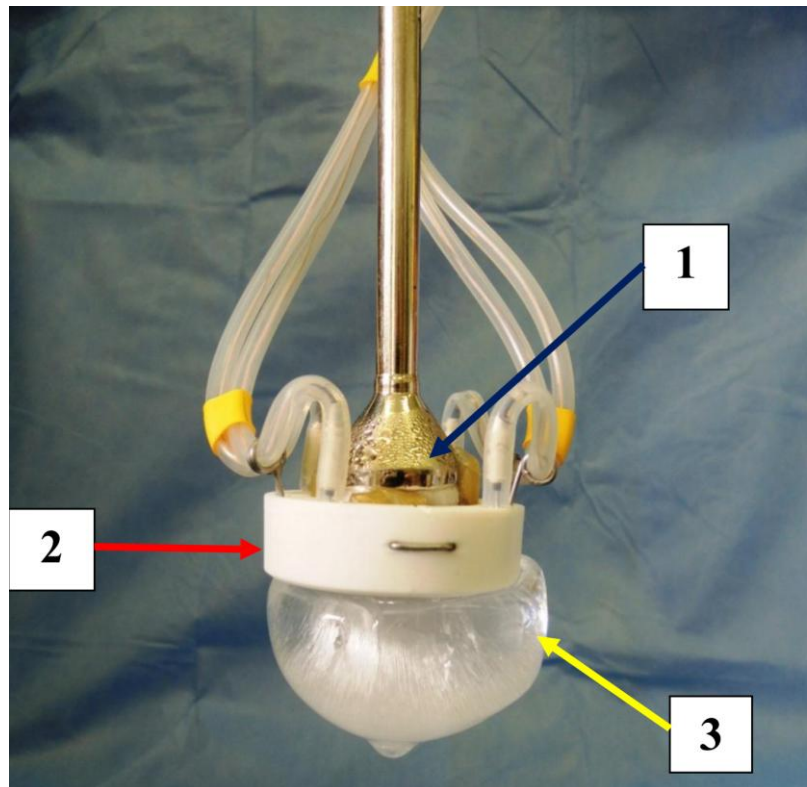


Рис. 3.7. Сформований сегмент льодяної кулі в дистильованій H_2O в кінці 10-ї хв кріодії:

- 1 – кріоаплікатор $\varnothing 20$ мм;
- 2 – КВІТ-4;
- 3 – сформований сегмент льодяної кулі

Об'єм кульового сегменту (V) розраховували за формулою 3.1

$$V = \pi H^2 \left(R - \frac{H}{3} \right), \quad (3.1)$$

де $\pi=3,14$;

H – висота кульового сегменту;

R – радіус кулі.

Значення вимірювань розмірів (висота, діаметр) та об'єму сформованого сегмента льодяної кулі в кінці 10-ї хв кріодії в розчинах 0,9 % NaCl, дистильованій H_2O та 36 % NaCl представлено в таблиці 3.3.

Таблиця 3.3

Розміри (висота, діаметр) та об'єм сегмента льодяної кулі в кінці 10-ї хв кріодії в розчинах 0,9 % NaCl, дистильованій H₂O та 36 % NaCl у вигляді медіани та її похибки, а також 95 % ВІ

| Показник | Розчин | | |
|--|---------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| | 0,9 % NaCl | 36 % NaCl | дистильована H ₂ O |
| Висота (см) | 1,8(0,04); 95 % ВІ: 1,8–1,9 | 1,1(0,04); 95 % ВІ: 1,0–1,1 | 2,0 (0,04); 95 % ВІ: 2,0–2,1 |
| Діаметр (см) | 3,6 (0,04); 95 % ВІ: 3,6–3,7 | 3,1 (0,042); 95 % ВІ: 3,0–3,1 | 4,8 (0,08); 95 % ВІ: 4,6–4,8 |
| Об'єм сегмента кулі (см ³) | 12,72 (0,37); 95 % ВІ: 12,21–13,23 | 4,49(0,35); 95 % ВІ: 3,66–4,49 | 21,78 (1,1); 95 % ВІ: 20,52–23,55 |

Об'єм сегмента льодяної кулі, що утворився в дистильованій H₂O, склав у середньому $(21,8 \pm 0,9)$ см³, що на **71,6 %** перевищує об'єм сегмента льодяної кулі в розчині 0,9 % NaCl та на **384,4 %** – в розчині 36 % NaCl. Найменший об'єм сегмента льодяної кулі серед трьох дослідних рідин утворюється при заморожуванні гіпертонічного розчину 36 % NaCl і в середньому складає $(4,2 \pm 0,3)$ см³, що на **64,7 %** менший від об'єму в 0,9 % NaCl [55].

Використовуючи метод дисперсійного аналізу для множинних порівнянь 3 вибірок (розчин 0,9 % NaCl, дистильована H₂O та 36 % NaCl) виявлено достовірну різницю між середнім об'ємом утвореного сегмента льодяної кулі на рівні значущості $p < 0,001$.

Використовуючи метод множинних порівнянь Шеффе (число ступенів вільності $k_1=2$, $k_2=6$) встановлено: середній об'єм утвореного сегменту льодяної кулі в розчині 0,9 % NaCl є статистично значущо більшим, ніж в 36 % NaCl на рівні значущості $p < 0,01$ ($F=58,01$); середній об'єм утвореного

сегменту льодяної кулі в розчині 0,9 % NaCl є статистично значущо меншим, ніж в дистильованій H₂O на рівні значущості $p < 0,01$ ($F=68,30$); середній об'єм утвореного сегменту льодяної кулі в розчині 36 % NaCl є статистично значущо меншим, ніж в дистильованій H₂O на рівні значущості $p < 0,01$ ($F=252,2$).

Таким чином, найбільший об'єм льоду при заморожуванні за 10 хвилин експозиції кріодії аплікатором діаметром 20 мм та робочою температурою на його поверхні -180°C утворюється в ємності з дистильованою H₂O.

Висновки

1. За результатами першого етапу дослідження встановлено, що при локальній кріодії кріоаплікатором \varnothing 20 мм з часом експозиції періоду заморожування 10 хв, найбільший об'єм льоду утворюється в дистильованій H₂O і складає в середньому $(21,8 \pm 0,9)$ см³, що на 71,6 % перевищує об'єм сегмента льодяної кулі в розчині 0,9 % NaCl та на 384,4 % – в розчині 36 % NaCl, для яких об'єми льоду склали $(12,7 \pm 0,3)$ см³ та $(4,2 \pm 0,3)$ см³ відповідно.

2. В дистильованій H₂O в кінці 10-ї хв локальної кріодії аплікатором \varnothing 20 мм досягаються середні температури в діапазоні мінусових значень по усіх чотирьох термопарах, що достовірно перевищують відповідні значення середніх температур як у розчині 0,9 % NaCl, так і 36 % NaCl на рівні значущості $p < 0,001$.

3. На підставі результатів першого етапу експериментального дослідження було висунуто гіпотезу, що дистильована H₂O може бути використана в якості ефективного засобу потенціювання локальної кріодії в біологічній тканині, внаслідок притаманних їй специфічних теплофізичних властивостей, а саме – холодопроведення та кристалоутворення.

3.3. Залежність морфологічних змін у клітинах карциноми Герена від часу експозиції в дистильованій Н₂О

Цитоморфологічне дослідження клітин карциноми Герена (контроль).
Для об'єктивізації цитопатоморфологічних змін у клітинах карциноми Герена, під час їх контакту з дистильованою Н₂О залежно від часу експозиції, нами спочатку було проведено якісне вивчення морфології даних клітин у групі порівняння препаратів.

Виходячи з даних у препаратах, встановлено, що карцинома Герена – низькодиференційований рак, що не утворює залозистоподібних структур. Клітини округлої форми з одним великим ядром та вузькою цитоплазмою (рис. 3.8А). Клітини розміщуються переважно роздільно, іноді у вигляді невеликих коротких тяжів, розділених сполучнотканинними компонентами у вигляді волокнистих структур (рис. 3.8Б).

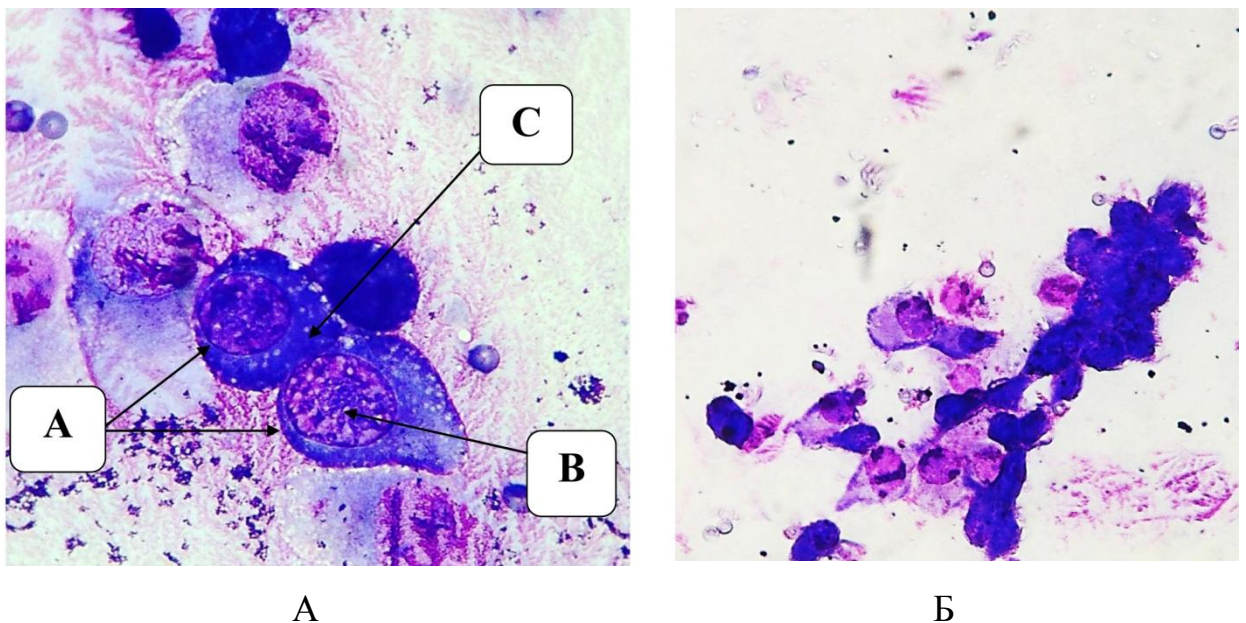


Рис. 3. 8. Карцинома Герена. Пухлинні клітини:

А – з великим ексцентрично розміщеним ядром (А), маргінальною структурою хроматину (В) і базофільною цитоплазмою (С). Забарвлення за Романовським. Зб. $\times 100$;

Б – у вигляді невеликих коротких тяжів, розділених сполучнотканинним компонентом. Забарвлення за Романовським. Зб. $\times 40$.

Карцинома Герена характеризується солідним типом росту. Клітини ростуть з компактним розміщенням у вигляді пластів. Характерними для даного типу клітин є ознаки: великий розмір клітини, інтенсивно забарвлена цитоплазма (базофільна), округлої форми ядро, що іноді має звивистий контур з маргінальною (див. рис. 3.8Б) структурою хроматину (основна особливість клітин даного типу пухлини) і великими ядерцями (2–4 в одному ядрі клітини), що розміщені ексцентрично (рис. 3.9А). Іноді в цитологічних препаратах групи порівняння на фоні звичайних типових клітин карциноми Герена зустрічались клітини, що гинуть в результаті запрограмованого апоптозу (рис. 3.9Б). Морфологічні зміни клітин в стані запрограмованого апоптозу відрізнялись за наступними ознаками: зменшення клітини в розмірах, пікноз ядра клітини, цитоплазма ставала світлою, хроматин конденсувався компактно під мембраною ядра по його периферії. За цими ознаками ми диференціювали клітини в стані запрограмованого апоптозу від клітин карциноми Герена, у яких розвинулась гідропічна дистрофія внаслідок осмотичного набряку в результаті контакту з дистильованою H_2O .

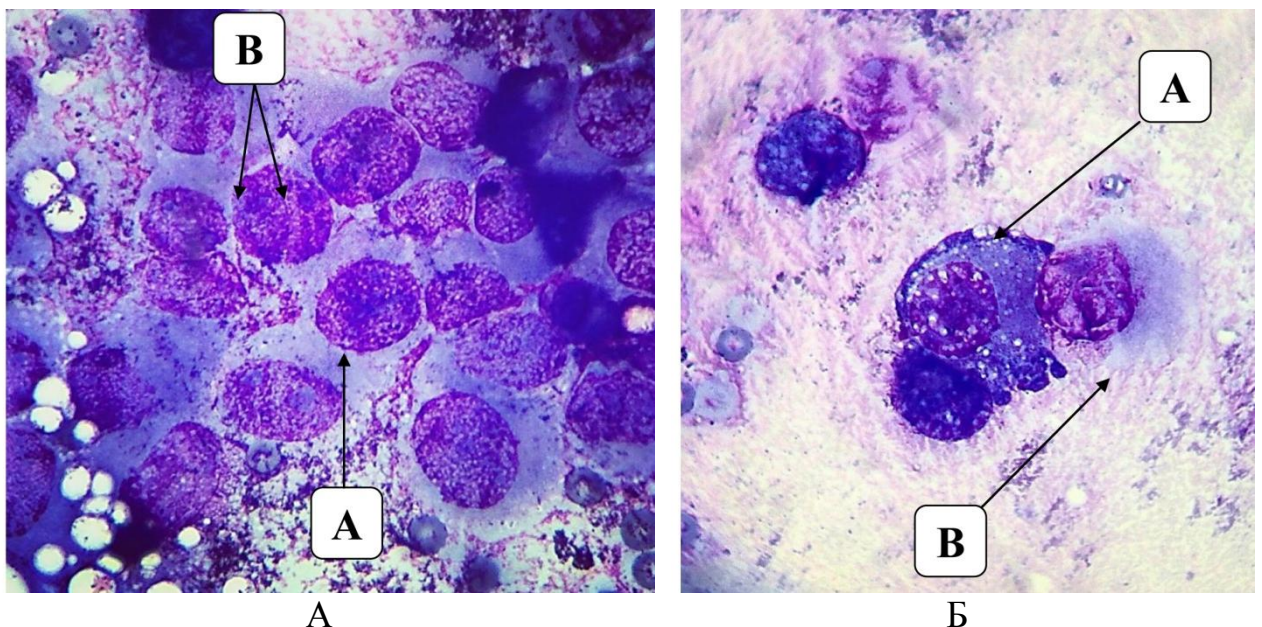


Рис. 3.9. Клітини карциноми Герена. Забарвлення за Романовським. 36×100 : А – з ядрами округлої форми (А) та великими ядерцями в кількості 1–3 (В); Б – нормальна клітина (А), клітина карциноми, що гине (апоптоз) (В)

Якісна характеристика морфологічних ознак, притаманних клітинам карциноми Герена (препарати групи порівняння), дозволила нам в подальшому виявити специфічні морфологічні «маркери» в клітинах даного типу пухлини після їх контакту з дистильованою H_2O (препарати дослідної групи).

Цитоморфологічне дослідження клітин карциноми Герена (дослідна група). При вивченні цитопатоморфологічних змін у клітинах карциноми Герена, що перебували в контакті з дистильованою H_2O при експозиції 5, 10 та 15 хв, було виявлено специфічні ознаки їх осмотичної деструкції.

Внаслідок підвищення осмотичного тиску в клітинах карциноми Герена відмічали ознаки гідропічної їх дистрофії: вакуолізація цитоплазми, збільшення розміру клітини і/або її ядра (рис. 3.10А). Цей процес супроводжувався специфічними «маркерами» (цитопатоморфологічними ознаками) необоротного пошкодження клітин у результаті їх гіпергідратації (осмотичної деструкції), а саме: розриви цитоплазматичної мембрани, ядра або їх поєднання. При дослідженні цитологічного матеріалу кожної з підгруп (5, 10 та 15 хв експозиції в дистильованій H_2O) дослідної групи препаратів, у клітинах, що руйнуються, нами були виявлені ранні дегенеративні ультраструктурні зміни, що виникають у ядрі та цитоплазмі. Ранні дегенеративні зміни супроводжувались збільшенням розміру клітини в результаті її гіпергідратації (зростала кількість гігантських клітин розміром до 60 мкм). Часто дана морфологічна картина доповнювалась наявністю супутньої вакуолізації цитоплазми. В подальшому відмічалось збільшення розміру ядра клітини та зміна кольору і структури хроматину.

При гідропічній дистрофії клітин карциноми Герена хроматин мав характерне світле забарвлення та структуру по типу «розпушування» та набухання за рахунок осмотичного набряку (рис. 3.10Б).

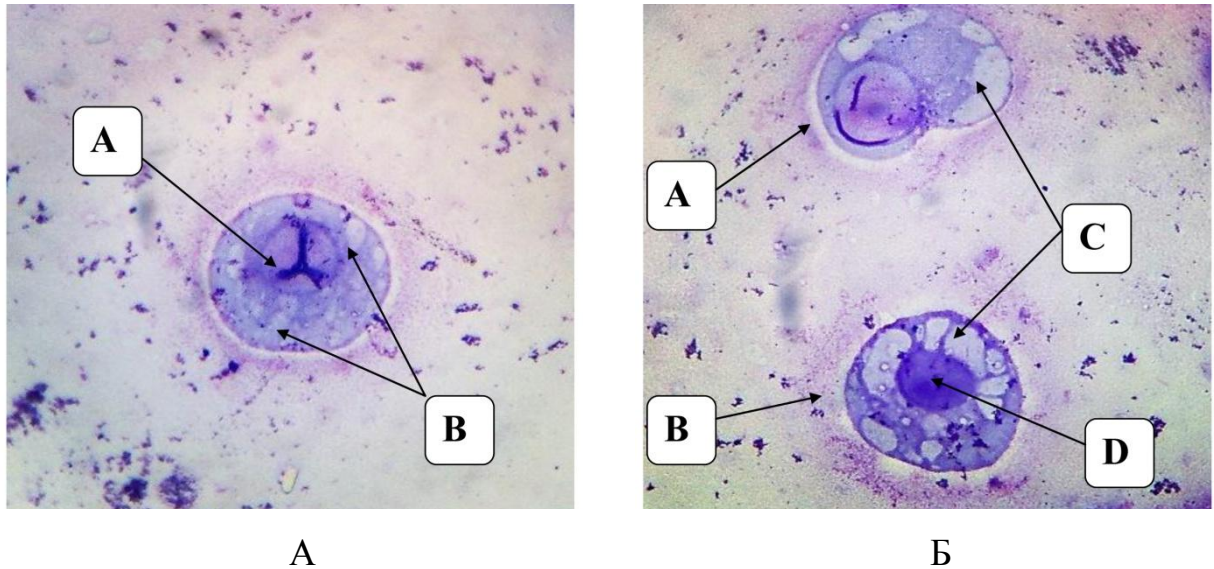


Рис. 3.10. Клітини карциноми Герена. Забарвлення за Романовським. 36.×100:

А – відмічаються розриви мембрани ядра (А), вакуолізація цитоплазми (В) (експозиція контакту з дистильованою H_2O – 5 хвилин);

Б – химерної (А) та округлої форми (В) зі слабобазофільною вакуолізованою цитоплазмою (С) та структурою хроматину у вигляді «розпушування» (D) (експозиція контакту з дистильованою H_2O – 10 хвилин)

Поява пізніх дегенеративних змін була логічним наслідком підвищення інтрацелюлярного тиску рідини. В цитоплазматичній мембрані клітин з'являлись поодинокі чи множинні лінійні розриви. В більшості клітин відмічався лише каріорексис без супутнього розриву цитоплазматичної мембрани. Однак, найчастіше виявлялась комбінована картина, при якій поєднувались розрив як цитоплазматичної мембрани, так і каріорексис.

Цитопатоморфологічні зміни ядер клітин завершувались їх фрагментацією з повним наступним руйнуванням (каріолізис, каріоліз) (рис. 3.11А). Форма лінії розриву мембрани ядра клітини найчастіше мала вигляд по типу знаку мерседес, хоча зустрічались і прості лінійні, півмісяцеві та χ -подібні варіанти. В підгрупі цитологічних препаратів, де клітини карциноми Герена перебували в контакті з дистильованою H_2O 15 хв зустрічались ознаки цитоклазії та повного цитолізу (рис. 3.11Б).

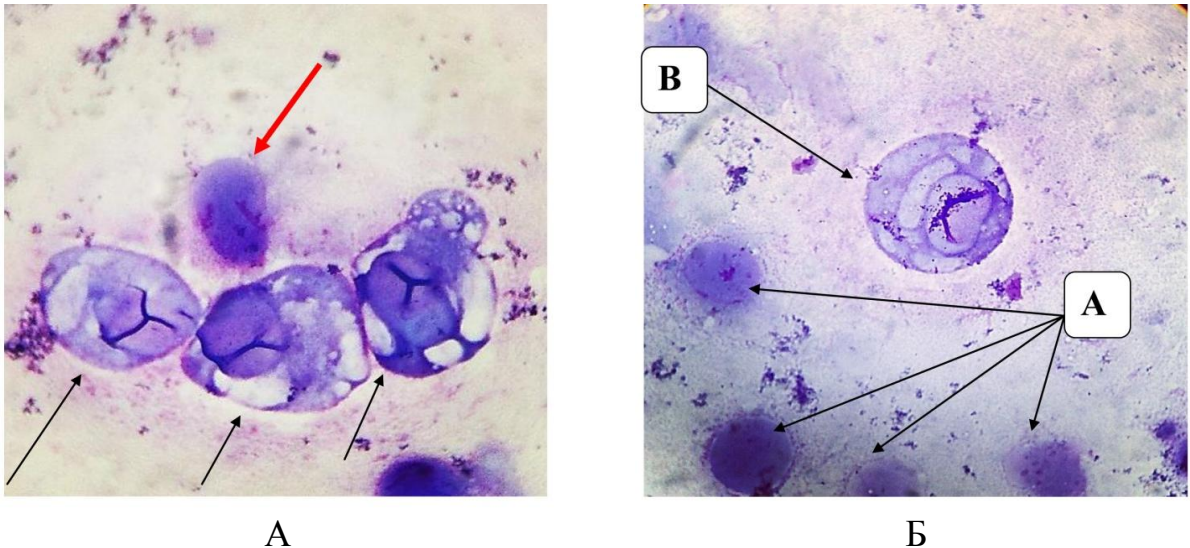


Рис. 3. 11. Клітини карциноми Герена. Забарвлення за Романовським.
36.× 100:

А – гідропічна дистрофія (позначено стрілками чорного кольору): гідратація, вакуолізація цитоплазми, каріорексис з початком фрагментації ядер. Цитоліз з початком каріолізу (позначено стрілкою червоного кольору);

Б – цитоліз пухлинних клітин на фоні «голих» ядер (позначено стрілками) (А), гігантська клітина з вакуолізованою цитоплазмою та каріорексисом (В) (експозиція контакту з дистильованою H_2O – 15 хвилин)

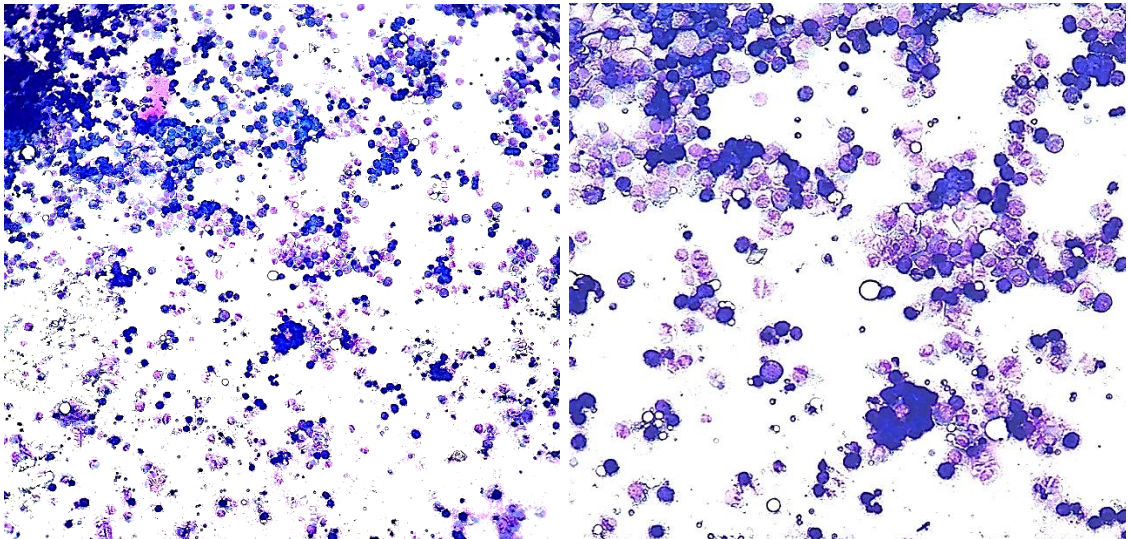
Наявність хоча б однієї, з наведених пізніх ознак дегенеративних змін, вважали абсолютним критерієм необоротної клітинної деструкції. В цитологічних препаратах клітин карциноми Герена в усіх підгрупах (5, 10 та 15 хв експозиції в дистильованій H_2O) основною патоморфологічною характеристикою був некроз (необоротний процес загибелі клітини, що виключає можливість її подальшого існування). В препаратах дослідної групи нами не виявлено жодної клітини нормальних розмірів та форми, яку можливо було порівняти з клітинами карциноми Герена препаратів групи порівняння. У всіх часових підгрупах (5, 10 та 15 хв експозиції контакту з дистильованою H_2O) дослідної групи цитологічних препаратів відмічались ранні дистрофічні морфологічні ознаки по типу гідропічної дистрофії та пізні дегенеративні зміни, що зі збільшенням часу експозиції контакту лише прогресували.

Якісна оцінка морфології клітин карциноми Герена в групі порівняння цитологічних препаратів та патоморфологічні ознаки клітин, що перебували в контакті з дистильованою H_2O (дослідна група препаратів), дозволили нам провести кількісний порівняльний аналіз між групами методом цитоморфометрії.

Цитоморфометричні дослідження змін у клітинах карциноми Герена після контакту з дистильованою H_2O . При цитоморфологічному дослідженні змін у клітинах карциноми Герена після впливу дистильованої H_2O з різним інтервалом експозиції, було описано якісні клітинні і структурні зміни. Однак, такий метод має суб'єктивний характер оцінки. Тому для об'єктивного судження про наявність змін нами було застосовано і представлено кількісний метод оцінки параметрів клітин.

Для об'єктивізації та статистичного узагальнення кількісних даних, проводили вимірювання розміру клітин карциноми Герена за допомогою програмного забезпечення – Altami Studio 3.4.0. Це дало змогу досліджувати та обробляти цифрові зображення мікрофотографій препаратів, проводити вимірювання (ручним, автоматичним способом) площі поперечного січення 100 пухлинних клітин в групі порівняння і дослідній групах. В ядрах клітин карциноми Герена дослідної групи при експозиції контакту з дистильованою H_2O як 5, 10, так і 15 хв відмічались настільки виражені дистрофічні необоротні зміни, що виміряти їх розмір для кількісного представлення даних не вдавалось.

При перегляді препарату за малого збільшенні ($\times 10$) відразу було видно, чи містить він достатню кількість клітин (рис. 3.12). Методика підрахунку клітин у полі зору передбачала визначення їх середньої кількості в 10 полях зору, починаючи з межі препарату вздовж горизонтального діаметра з врахуванням FN (Field number) – величини поля зору окулярів, або показника зони видимості, що вказаний на окулярах. Поділивши значення цього показника на збільшення об'єктива отримуємо діаметр видимого в окуляр поля мікроскопа в міліметрах.



А

Б

Рис. 3.12. Достатня кількість клітин у полі зору. Забарвлення за Романовським. Зб. \times 10 (А), зб. \times 40 (Б).

Вимірювання проводились за збільшення \times 100 за допомогою імерсійного масла відповідно під калібрування програми і FN (рис. 3.13). З окуляром FN 20 і об'єктивом \times 10 та \times 40 було візуалізовано 7–9 клітин у полі зору відповідно. За допомогою програми Altami Studio 3.4.0 вимірювали розміри 100 пухлинних клітин як у групі порівняння (рис. 3.13), так і в дослідній групі (рис. 3.14).

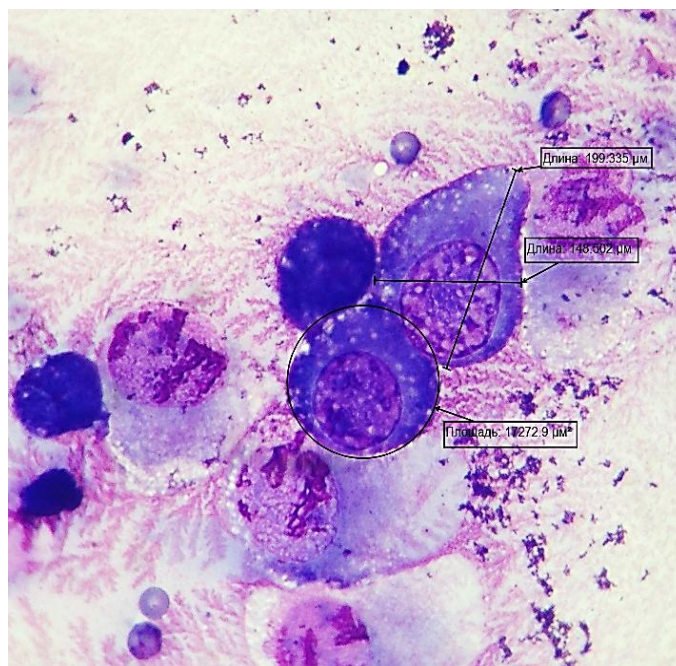


Рис. 3.13. Морфометрія клітин карциноми Герена (група порівняння).

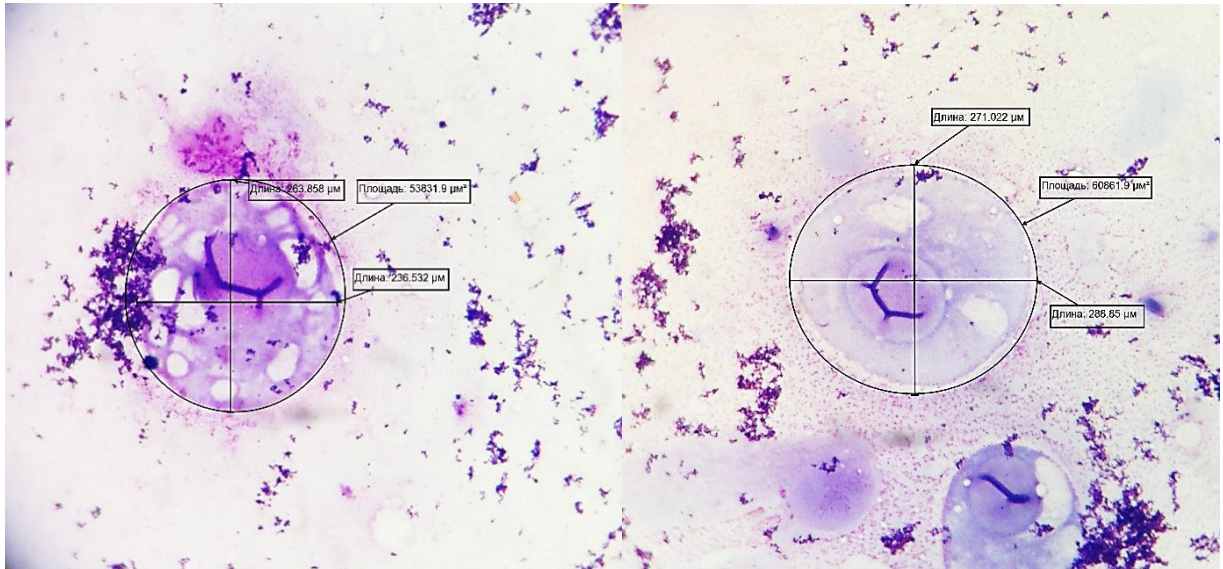


Рис. 3.14. Морфометрія клітин карциноми Герена (дослідна група).

Результати вимірювань отримували в одній з найбільш частих одиниць представлення малих довжин – нанометрах (нм), та отримані результати переводили в мікрометри (мкм) – $1000 \text{ нм} = 1 \text{ мкм}$.

Статистичну обробку даних проводили в авторському пакеті MedStat [37]. Результати вимірювань площі 100 клітин карциноми Герена в групі порівняння та кожній з підгруп дослідної групи препаратів (5, 10 та 15 хв експозиції) представлено в таблиці 3.4 та на рисунку 3.15 у вигляді медіани та її похибки ($M \pm m$), а також на рисунку 3.16 у вигляді коробкового графіка *box-plot*.

Таблиця 3.4

Морфометричні дані площі (S) клітин карциноми Герена в ГП та ДГ у вигляді медіани та похибки медіани ($M \pm m$) в мкм^2

| Величина | Група | | | |
|--|----------------|------------------|------------------|------------------|
| | порівняння | дослідна | | |
| | | ГП | ДГ (5 хв) | ДГ (10 хв) |
| Медіана площі клітин (мкм^2) $M \pm m$ | $17,3 \pm 0,1$ | $59,7 \pm 0,5^*$ | $60,2 \pm 0,4^*$ | $55,8 \pm 0,8^*$ |

Примітка. * – це статистично значуща різниця ($p < 0,05$) між ДГ порівняно з ГП.

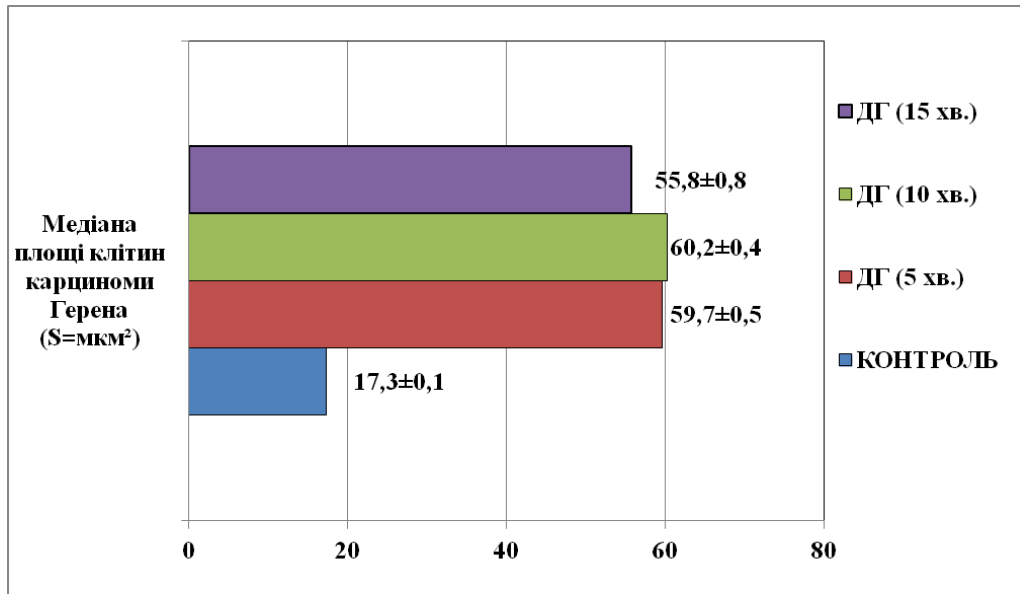


Рис. 3.15. Представлення даних у вигляді діаграми (медіана площі клітин карциноми Герена в ДГ та ГП (контроль)).

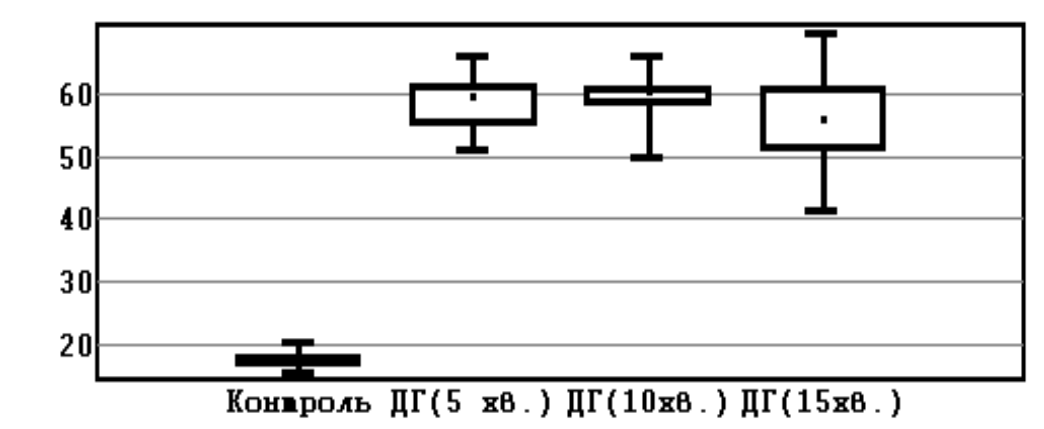


Рис. 3.16. Представлення даних площі клітин карциноми Герена в ГП та ДГ у вигляді box-plot.

Різницю між групами вважали достовірною при значенні $p < 0,05$. Проводили перевірку закону розподілу даних у групах на нормальність, застосовуючи критерій хі-квадрат (χ^2). У групі порівняння (ГП) розподіл не відрізняється від нормального на рівні значущості $p = 0,331$. В дослідній групі (ДГ): підгрупа (5 хв) – розподіл відрізняється від нормального на рівні значущості $p \leq 0,001$; підгрупа (10 хв) – розподіл відрізняється від нормального на рівні $p \leq 0,001$; підгрупа (15 хв) – розподіл відрізняється від нормального на рівні $p = 0,023$.

Для порівняння кількісних показників в ДГ з ГП, оскільки закон розподілу відмінний від нормального – використано критерій Данна. Статистичний аналіз отриманих даних показав, що різниця середньої площі клітин карциноми Герена, які перебували в контакті з дистильованою H_2O при експозиції як 5 хв, так і 10 та 15 хв (дослідна група) є достовірною на рівні значущості $p < 0,01$ порівняно з ГП. При порівнянні середньої площі клітин карциноми Герена в дослідній групі, залежно від часу експозиції їх контакту з дистильованою H_2O , статистично значущої різниці не виявлено між ДГ (5 хв) та ДГ (10 хв), $p > 0,05$. Також статистично значущої різниці не виявлено між ДГ (5 хв) та ДГ (15 хв), де $p > 0,05$. При порівнянні середньої площі клітин між ДГ (10 хв) та ДГ (15 хв) виявлено достовірну різницю на рівні значущості $p < 0,05$. Отже, через 10 та 15 хв від моменту початку контакту пухлинних клітин з дистильованою H_2O їх середній розмір не збільшується, що свідчить про досягнення максимального ефекту гідратації в перші 5 хв експозиції. При цьому в 100 % клітин карциноми Герена дослідної групи, починаючи з 5-ї хв експозиції їх контакту з дистильованою H_2O було виявлено необоротні деструктивні зміни, що зі збільшенням часу експозиції до 10 та 15 хв вело лише до їх прогресування та клітинної загибелі [56].

Висновки

1. Час експозиції тривалістю 5 хв є достатнім при контакті пухлинних клітин карциноми Герена з дистильованою H_2O для розвитку максимальної їх гідратації за рахунок осмосу.
2. Середній розмір клітин карциноми Герена, що перебували в контакті з дистильованою H_2O , починаючи з 5-ї хвилини експозиції збільшується не менш ніж у 3,4 рази порівняно з групою порівняння.
3. В 100 % клітин карциноми Герена, починаючи з 5-ї хвилини їх контакту з дистильованою H_2O , відмічаються необоротні морфологічні зміни з різним ступенем деструкції, що ведуть до неминучої клітинної загибелі. Зі збільшенням часу експозиції контакту пухлинних клітин з дистильованою H_2O до 10 та 15 хв деструктивні зміни продовжують тільки прогресувати.

3.4. Результати дослідження процесу локальної кріодії, потенційованого дистильованою H₂O, на моделі печінки свині за відсутності спланхнічного кровотоку (*in vitro*)

Отримані нами результати першого та другого етапу експериментального дослідження дають підстави для припущення, що введення дистильованої H₂O в біологічну тканину, у т. ч. пухлинну, за 5 хв до початку локальної кріодії може посилювати (потенціювати) процес кріодеструкції за рахунок ефекту гідратації клітин унаслідок їх осмотичного набряку. Як відомо, одним з механізмів загибелі клітин біологічної тканини під час локальної кріодії є пошкодження їх мембрани інтрацелюлярними кристалами льоду. Вода в цитоплазмі клітини – це джерело формування кристалів льоду, що на етапі спонтанного відтавання продовжують зростати та пошкоджують структури клітини.

Метою третього етапу експериментального дослідження було отримання відповіді на запитання, чи посилює процес локальної кріодії попереднє введення дистильованої H₂O в біологічну тканину за відсутності кровотоку. Для досягнення поставленої мети: вивчали динаміку змін температури на дискретних глибинах у фіксованих точках біологічної тканини під час локальної кріодії подвійним циклом без застосування та із застосуванням попереднього введення в тканину дистильованої H₂O; досліджували морфологічні зміни, які відбуваються в тканині печінки свині, після локальної кріодії подвійним циклом та через 5 хв після введення дистильованої H₂O з наступним проведенням локальної кріодії подвійним циклом.

Результати порівняльного аналізу динаміки змін температури на дискретних глибинах експериментальної моделі печінки свині за умови відсутності спланхнічного кровотоку при локальній кріодії, потенційованій введенням дистильованої H₂O. При порівнянні показників середніх температур в ГП та ОГ різницю вважали статистично достовірною на рівні

значущості $p < 0,05$. Фото- та відеофіксацію етапів експерименту проводили камерою Nikon COOLPIX P310.

Загальний вигляд процесу термометрії під час локального кріовпливу представлено на рисунку 3.17.

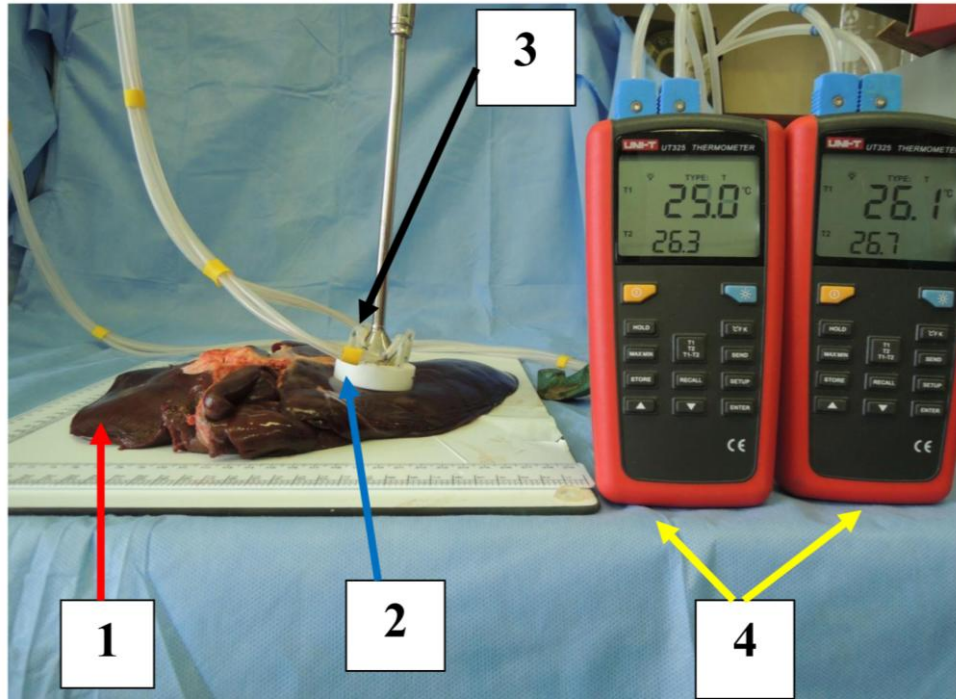
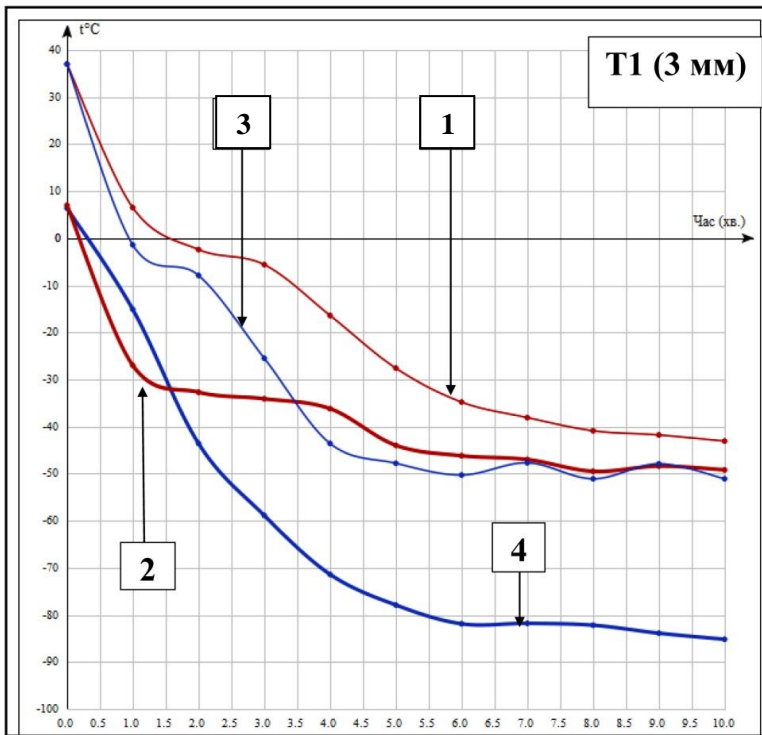


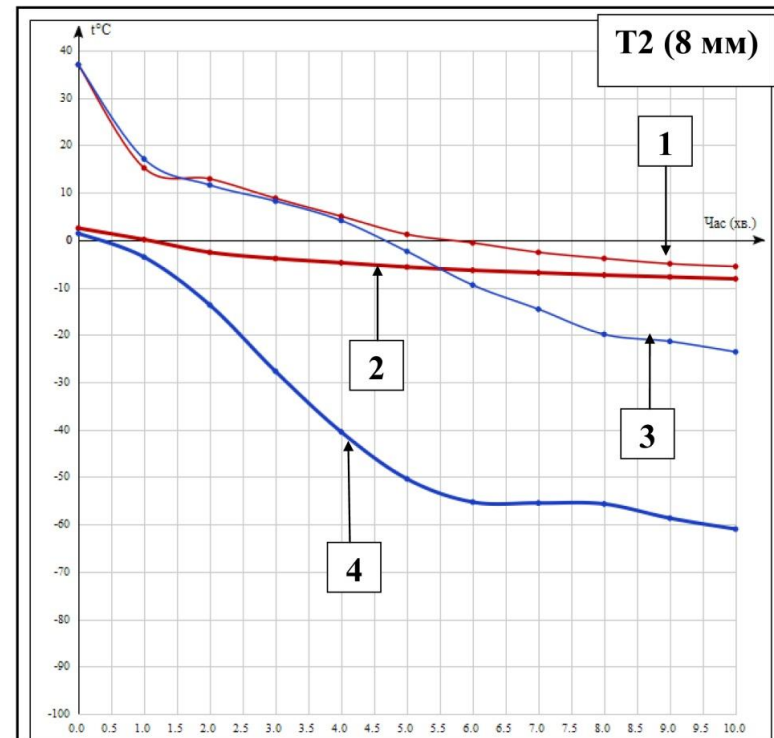
Рис. 3.17. Схема термометрії на дискретних глибинах у тканині печінки свині під час процесу кріодеструкції:

- 1 – печінка свині;
- 2 – тримач термопар;
- 3 – кріоаплікатор діаметром 20 мм;
- 4 – КВІТ-4

Методологія подальша проведення кріодеструкції тканини печінки та реєстрації температур на дискретних глибинах не відрізнялась від описаної в першому етапі експерименту з дистильованою H_2O , розчином 0,9 % $NaCl$ та 36 % $NaCl$. Експеримент повторювали тричі. Для зручності візуального сприйняття динаміки зниження температури по показниках термопар T1–T4 побудовано графіки з термограмами (рис. 3.18, 3.19). Для ГП дані представлено в таблиці 3.5, для ОГ – в таблиці 3.6.



А

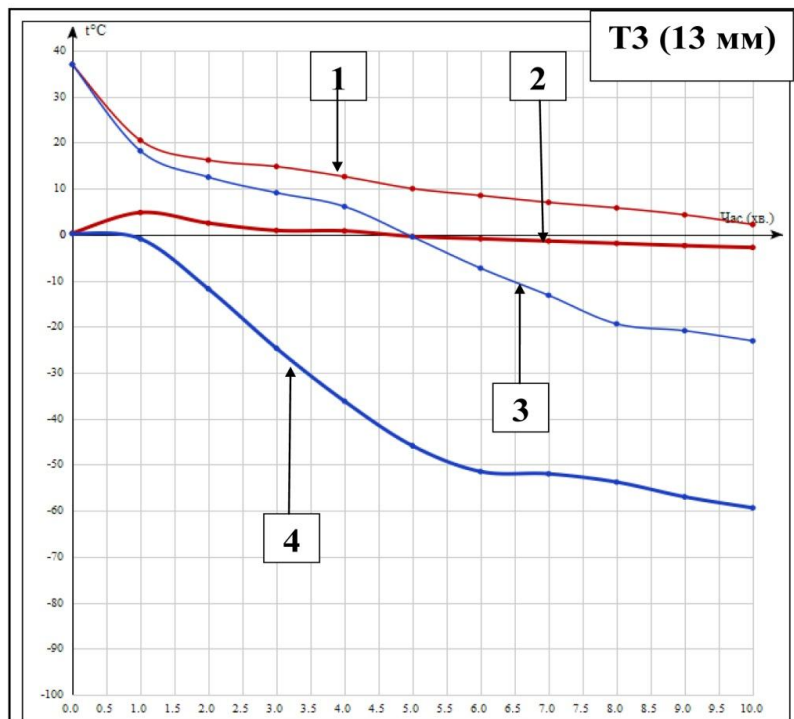


Б

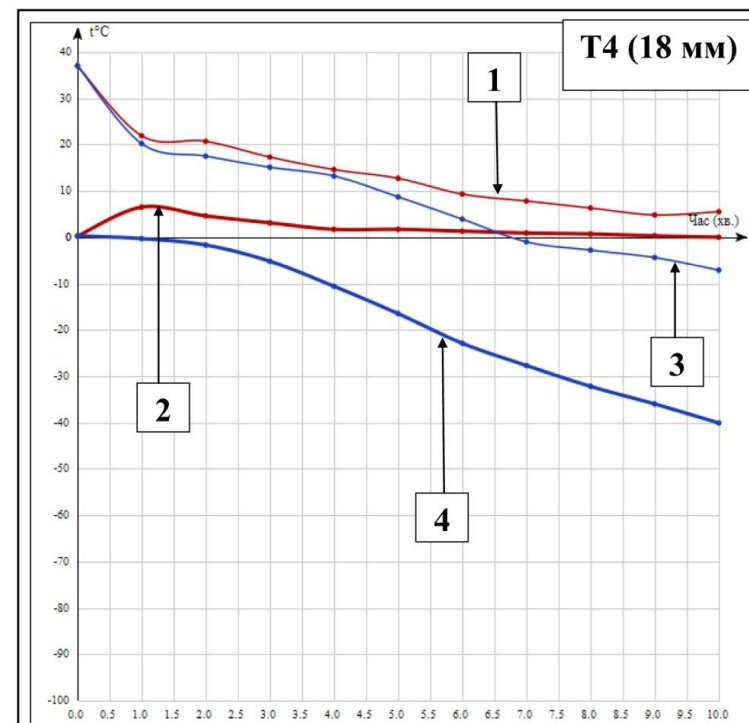
Рис. 3.18. Графічне зображення динаміки зниження температури в печінці свині (*in vitro*) подвійним циклом заморозки без кріопотенціювання (ГП) та з потенціюванням дистильованої H_2O (ОГ): 1 – крива динаміки зниження температур без кріопотенціювання (перший цикл заморозки); 2 – крива динаміки зниження температур без кріопотенціювання (другий цикл заморозки); 3 – крива динаміки зниження температур з потенціюванням дистильованою H_2O (перший цикл заморозки); 4 – крива динаміки зниження температур з потенціюванням дистильованою H_2O (другий цикл заморозки):

А – по показнику термопарі Т1 на глибині 3 мм від поверхні кріоаплікатора;

Б – по показнику термопарі Т2 на глибині 8 мм від поверхні кріоаплікатора.



А



Б

Рис. 3.19. Графічне зображення динаміки зниження температури в печінці свині (*in vitro*) подвійним циклом заморозки без кріопотенціювання (ГП) та з потенціюванням дистильованою H_2O (ОГ): 1 – крива динаміки зниження температур без кріопотенціювання (перший цикл заморозки); 2 – крива динаміки зниження температур без кріопотенціювання (другий цикл заморозки); 3 – крива динаміки зниження температур з потенціюванням дистильованою H_2O (перший цикл заморозки); 4 – крива динаміки зниження температур з потенціюванням дистильованою H_2O (другий цикл заморозки):

А – по показнику терморпари Т3 на глибині 13 мм від поверхні кріоаплікатора;

Б – по показнику терморпари Т4 на глибині 18 мм від поверхні кріоаплікатора.

Таблиця 3.5

Динаміка зниження температур під час кріодії подвійним циклом

(один цикл – 10 хв) без кріопотенціювання (ГП) на дискретних глибинах у печінці свині (*in vitro*) на глибині 3, 8, 13, 18 мм від робочої поверхні кріоаплікатора Ø 20 мм по показниках термопар Т1, Т2, Т3 та Т4 КВІТ-4

| Цикл заморозки | | Перший цикл заморозки | | | | Другий цикл заморозки | | | |
|------------------------|----|-----------------------|-------------|-------------|-------------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| Номер термопар | | Т1 (3 мм) | Т2 (8 мм) | Т3 (13 мм) | Т4 (18 мм) | Т1 (3 мм) | Т2 (8 мм) | Т3 (13 мм) | Т4 (18 мм) |
| Хвилина кріодеструкції | 0 | +37 | +37 | +37 | +37 | +7,0 (0,3) | +2,4 (0,2) | +0,4 (0,2) | +0,2 (0,05) |
| | 1 | +6,5 (0,3) | +15,1 (0,1) | +20,6 (0,3) | +22,3 (0,3) | -27,0 (0,1) | -0,3 (0,2) | +4,5 (0,2) | +6,0 (0,2) |
| | 2 | -2,4 (0,3) | +12,1 (0,6) | +16,3 (0,2) | +20,9 (0,4) | -32,7 (0,2) | -2,9 (0,2) | +2,4 (0,1) | +4,5 (0,1) |
| | 3 | -5,6 (0,4) | +8,2 (0,3) | +14,3 (0,4) | +17,5 (0,3) | -34,1 (0,2) | -4,0 (0,1) | +0,9 (0,1) | +3,1 (0,1) |
| | 4 | -16,4 (0,4) | +4,6 (0,3) | +12,5 (0,2) | +14,6 (0,3) | -36,2 (0,6) | -5,2 (0,2) | +0,1 (0,4) | +1,4 (0,1) |
| | 5 | -27,6 (0,5) | +1,3 (0,1) | +10,0 (0,2) | +12,4 (0,2) | -44 (0,6) | -5,7 (0,1) | -0,7 (0,1) | +1,3 (0,2) |
| | 6 | -34,8 (0,6) | -0,9 (0,2) | +8,0 (0,3) | +9,3 (0,3) | -46,2 (0,2) | -6,5 (0,05) | -1,0 (0,05) | +1,0 (0,1) |
| | 7 | -38,1 (0,2) | -2,6 (0,1) | +6,8 (0,2) | +7,8 (0,2) | -47,0 (0,2) | -7,0 (0,05) | -1,3 (0,1) | +0,9 (0,03) |
| | 8 | -40,9 (0,4) | -4,2 (0,2) | +5,2 (0,3) | +6,3 (0,1) | -49,5 (1,2) | -7,9 (0,3) | -2,1 (0,1) | +0,5 (0,1) |
| | 9 | -41,8 (0,3) | -5,1 (0,1) | +4,0 (0,2) | +5,7 (0,1) | -48,4 (0,9) | -8,3 (0,2) | -2,5 (0,1) | +0,3 (0,03) |
| | 10 | -43,1 (0,3) | -5,6 (0,2) | +2,0 (0,1) | +4,6 (0,1) | -49,2 (0,2) | -8,5 (0,2) | -3,0 (0,1) | -0,1 (0,08) |

Таблиця 3.6

Динаміка зниження температур під час кріодії подвійним циклом

(один цикл – 10 хв) з кріопотенціюванням (ОГ) розчином дистильованої Н₂О на дискретних глибинах у печінці свині (*in vitro*) на глибині 3, 8, 13, 18 мм від робочої поверхні кріоаплікатора Ø 20 мм по показниках термодатчиків Т1, Т2, Т3 та Т4 КВІТ-4

| Цикл заморозки | | Перший цикл заморозки | | | | Другий цикл заморозки | | | |
|------------------------|----|-----------------------|------------|------------|------------|-----------------------|------------|------------|------------|
| Номер термодатчиків | | Т1 (3 мм) | Т2 (8 мм) | Т3 (13 мм) | Т4 (18 мм) | Т1 (3 мм) | Т2 (8 мм) | Т3 (13 мм) | Т4 (18 мм) |
| Хвилина кріодеструкції | 0 | +37 | +37 | +37 | +37 | +6,4(0,4) | +1,1(0,3) | +0,2(0,1) | +0,3(0,1) |
| | 1 | -1,4(0,2) | +16,7(0,5) | +18,0(0,3) | +20,3(0,6) | -15,1(0,4) | -3,7(0,5) | -1,3(0,4) | -0,4(0,2) |
| | 2 | -7,9(0,2) | +11,5(0,6) | +13,2(0,5) | +17,3(0,4) | -43,6(1,0) | -13,7(0,8) | -11,2(0,4) | -1,9(0,4) |
| | 3 | -25,5(0,3) | +8,1(0,5) | +9,5(0,6) | +15,5(0,6) | -58,9(0,9) | -27,2(0,9) | -24,7(0,4) | -5,6(0,7) |
| | 4 | -43,6(0,2) | +4,1(0,4) | +6,4(0,4) | +12,8(1,0) | -71,4(0,7) | -40,8(0,7) | -36,5(0,7) | -10,9(0,7) |
| | 5 | -47,8(0,5) | -2,6(0,1) | -0,8(0,2) | +7,9(1,1) | -77,9(0,6) | -50,6(0,4) | -46(0,3) | -16,8(0,7) |
| | 6 | -50,3(0,2) | -9,5(0,4) | -7,6(0,5) | +3,5(0,5) | -81,9(0,4) | -54,5(0,5) | -51,2(0,6) | -23,6(1,0) |
| | 7 | -47,7(0,4) | -14,8(0,4) | -13,5(0,4) | -1,1(0,4) | -81,8(0,3) | -55,0(0,3) | -52,0(0,9) | -27,3(1,2) |
| | 8 | -51,1(0,6) | -20,2(0,9) | -19,6(0,4) | -2,8(0,3) | -82,2(0,5) | -55,8(0,5) | -53,5(0,5) | -33,5(1,6) |
| | 9а | -47,9(0,3) | -21,9(0,4) | -20,7(0,4) | -4,5(0,3) | -83,9(0,2) | -58,3(0,5) | -57,1(0,3) | -36,9(1,3) |
| | 10 | -51,1(0,8) | -23,9(0,2) | -23,1(0,4) | -7,4(0,7) | -85,2(0,2) | -61,1(0,6) | -59,5(0,2) | -40,5(0,8) |

При порівнянні отриманих середніх значень температур по показниках першої термопари в ГП та ОГ на глибині 3 мм протягом першого циклу кріовпливу було виявлено значущо нижчі показники температур в ОГ, починаючи з 1-ї та до 10-ї хв включно ($p < 0,001$).

Порівнюючи середні значення температур по показниках першої термопари в ГП та ОГ на глибині 3 мм протягом другого циклу кріовпливу було виявлено: в кінці 1-ї хв кріовпливу другого циклу досягнута температура в ГП була статистично значущо нижча, ніж у ОГ ($p < 0,001$). Надалі на рисунку 3.24 відмічається перехрест кривої 2 та кривої 4 між 1-ю та 2-ю хвилинами кріовпливу. Після перехресту кривих в ОГ досягнуто значущо нижчі показники температур, починаючи з 2-ї та до 10-ї хв кріовпливу включно ($p < 0,001$).

Середні значення температур по показниках другої термопари в ГП та ОГ на глибині 8 мм протягом першого циклу кріовпливу відрізнялись: в кінці 1-ї хв температура в ГП була значущо вища, ніж в ОГ ($p = 0,04$); в кінці 2-ї хв кріовпливу значущої різниці між отриманими температурами в ГП та ОГ не виявлено ($p = 0,511$); в кінці 3-ї хв кріовпливу значущої різниці між отриманими температурами в ГП та ОГ не виявлено ($p = 0,866$); в кінці 4-ї хв кріовпливу значущої різниці між отриманими температурами в ГП та ОГ не виявлено ($p = 0,479$). В ОГ досягнуто нижчі показники температур, починаючи з 5-ї та до 10-ї хв кріовпливу включно ($p < 0,001$).

Аналіз середніх значень температур по показниках другої термопари в ГП та ОГ на глибині 8 мм протягом другого циклу кріовпливу показав, що в ОГ, починаючи з 1-ї та до 10-ї хв включно, досягаються температури нижчі, ніж у ГП ($p = 0,003$ для 1-ї хв кріовпливу та $p < 0,001$ – для температур у діапазоні часу другого циклу кріовпливу з 2-ї до 10-ї хв включно).

Протягом першого циклу кріовпливу значення середньої температури по показниках третьої термопари, встановленої на глибині 13 мм, починаючи з 1-ї та до 10-ї хв включно, в ОГ досягали нижчих ніж в ГП ($p = 0,004$ – для 1-ї хв кріовпливу; $p = 0,005$ – для 2-ї хв кріовпливу, $p = 0,003$ – для 3-ї хв кріовпливу;

для температур в діапазоні часу першого циклу кріовпливу з 4-ї до 10-ї хв включно – $p < 0,001$).

При порівнянні отриманих середніх значень температур по показниках третьої термопари в ГП та ОГ на глибині 13 мм протягом другого циклу кріовпливу було виявлено, що в ОГ, починаючи з 1-ї та до 10-ї хв включно, досягаються температури нижчі, ніж у ГП ($p < 0,001$).

Порівнюючи середні значення температур по показниках четвертої термопари в ГП та ОГ на глибині 18 мм протягом першого циклу кріовпливу було виявлено, що в ОГ, починаючи з 1-ї до 3-ї хв та з 6-ї до 10-ї хв кріовпливу включно, досягаються температури нижчі, ніж в ГП (для 1-ї хв – $p = 0,044$; для 2-ї – $p = 0,003$; для 3-ї хв – $p = 0,037$; з 6-ї до 10-ї хв – $p < 0,001$). Не виявлено значущої різниці середніх температур між ГП та ОГ лише вкінці 4-ї та 5-ї хв кріовпливу першого циклу (для 4-ї хв різниця температур ($p = 0,159$); для 5-ї хвилини – ($p = 0,062$)).

Середні температури, зареєстровані КВІТ-4 по показниках четвертої термопари, встановленої на глибині 18 мм від робочої поверхні кріоаплікатора, протягом другого циклу кріовпливу, починаючи з 1-ї та до 10-ї хв включно в ОГ були нижчі порівняно з ГП ($p < 0,001$). Звертає на себе увагу 2-га крива динаміки зниження температур на рис. 3.27: протягом 10-ти хв кріовпливу 2-го циклу без кріопотенціювання температура не досягає значень нижчих за $-0,1$ °С.

При аналізі отриманих результатів особливу увагу приділяли статистично значущій різниці показників середніх температур, зафіксованих в кінці 10-ї хв другого циклу кріовпливу між ГП та ОГ.

Щодо вихідного значення температури печінки свині, яка становила в обох групах 37 °С було встановлено, що в ОГ на глибині 3 мм від робочої поверхні кріоаплікатора в кінці 10-ї хв другого циклу кріовпливу середня температура на $97,2$ % нижча, ніж в ГП; на глибині 8 мм – на $142,1$ % нижча, ніж в ГП; на глибині 13 мм – на $152,7$ % нижча ніж в ГП; на глибині 18 мм – на 109 % нижча ніж в ГП.

Таким чином, було встановлено, що в ОГ, де за 5 хв до початку локального кріовпливу в паренхіму печінки свині вводили дистильовану H_2O , в кінці 10-ї хв як першого, так і другого циклів кріовпливу на всіх глибинах (3, 8, 13 та 18 мм) отримано достовірно нижчі середні значення температур, ніж в ГП (дистильовану H_2O не вводили) на рівні значущості у всіх випадках $p < 0,001$ [21, 22].

Необхідні подальші дослідження ефектів, що чинить введена в біологічну тканину дистильована H_2O перед початком проведення процесу локальної кріовпливу, у т. ч. – на експериментальних моделях перещеплених солідних пухлин *in vivo*. Під час локального кріовпливу залишається не вивченим характер температурних та морфологічних змін у солідній зляксісній пухлині на дискретних глибинах при попередньому введенні в її тканину дистильованої H_2O .

Введення в біологічну тканину дистильованої H_2O за 5 хв до початку процесу локального кріовпливу, за відсутності спланхнічного кровотоку, чинить потенціуючий ефект, що проявляється в досягненні нижчих показників температур в діапазоні мінусових значень у т. ч. – найвіддаленіших від робочої поверхні кріоаплікатора ділянках.

В ОГ на глибині 3 мм від робочої поверхні кріоаплікатора в кінці 10-ї хв другого циклу кріовпливу середня температура на 97,2 % нижча ніж в ГП ($t_{кр} = -49,2 (0,2) < t_{ог} = -85,2 (0,2)$); на глибині 8 мм – на 142,1 % нижча ніж в ГП ($t_{кр} = -8,5 (0,2) < t_{ог} = -61,1 (0,6)$); на глибині 13 мм – на 152,7 % нижча ГП ($t_{кр} = -3 (0,1) < t_{ог} = -59,5 (0,2)$) та на 109 % нижча ніж в ГП на глибині 18 мм ($t_{кр} = -0,1 (0,08) < t_{ог} = -40,5 (0,8)$).

Морфологічні зміни в тканині печінки свині після локальної кріодії подвійним циклом заморозки з потенціюванням дистильованою H_2O та без. Після двох циклів заморозки виконували забір ділянки тканини печінки, що піддавалась кріодії, як матеріалу для подальшого морфологічного дослідження. Зріз тканини печінки свині поміщали в ємність з 10 % формаліном. Гістологічні препарати готували за стандартизованою

методикою. З метою порівняння патоморфологічних змін, що виникають у тканині печінки свині після локальної кріодії подвійним циклом заморозки без потенціювання дистильованою H_2O та з попереднім потенціюванням, в якості контролю спочатку було досліджено зразки гістологічного матеріалу печінки свині без будь-яких локальних фізико-хімічних впливів (рис. 3.20).

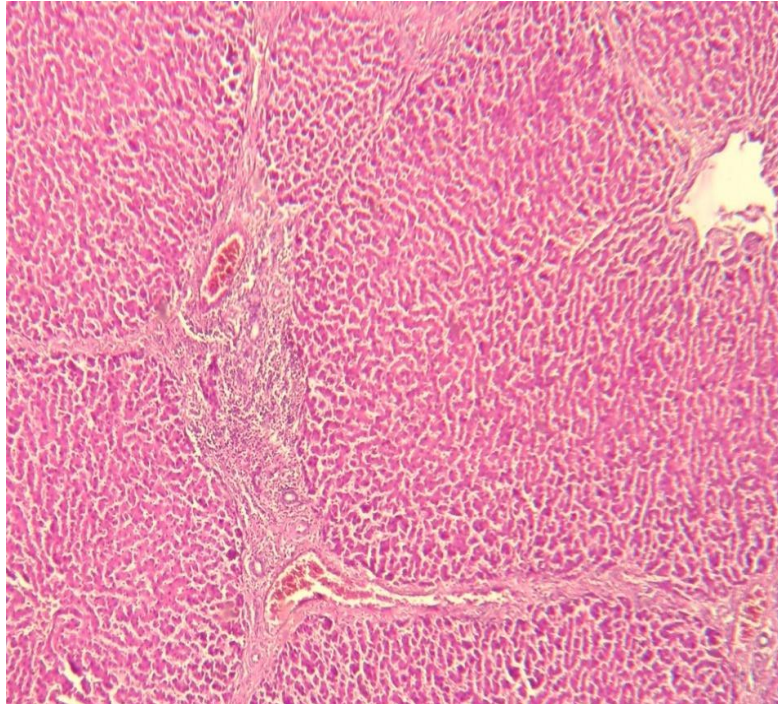


Рис. 3.20. Печінка свині без будь-яких фізико-хімічних впливів (контроль).

Структура печінки свині має типовий класичний вигляд. Гепатоцити формують печінкові балки, що орієнтовані радіально, які утворюють печінкові часточки. По периферії печінкових часточок добре візуалізуються портальні простори. В центрі кожної печінкової часточки чітко простежується центральна вена.

Після двох циклів локальної кріодії на тканину печінки свині (рис. 3.21А), за відсутності спланхнічного кровотоку, в матеріалі гістологічних препаратів відмічаються патоморфологічні зміни паренхіматозних та стромальних елементів.

В більшості гепатоцитів по периферії печінкової часточки відбулось порушення цілісності цитоплазматичної мембрани, збільшилися міжклітинні

простори між гепатоцитами за рахунок виходу цитоплазми в інтерстицій. В гепатоцитах, розташованих довкола центральної вени часточки, – візуалізуються пікнотично змінені ядра. Колагенові волокна міжчасточкової сполучної тканини дезорганізовані, з розривами. Найзначніші патоморфологічні зміни відзначались в препаратах тканини печінки свині, де за 5 хв до початку локальної кріодії подвійним циклом було введено 20 мл дистильованої H_2O (рис. 3.21Б).

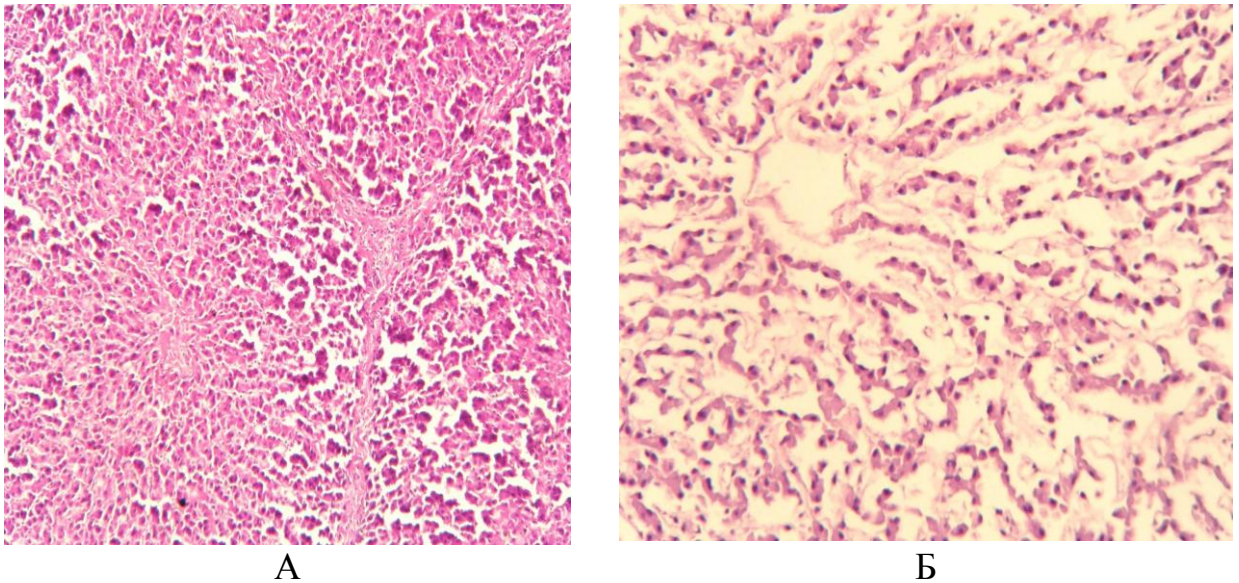


Рис. 3.21. Печінка свині (час експозиції періоду заморозки кожного циклу – 10 хв, відтавання – спонтанне):

А – після двох циклів локальної кріодії

Б – після введення 20 мл дистильованої H_2O та двох циклів локальної кріодії

Типова гістологічна структура печінкових часточок була значно порушена: відзначалась повна дезорганізація стромальних елементів, необоротні дистрофічні зміни гепатоцитів. Значна кількість гепатоцитів перебували в стані цитоклазії, відмічався різко виражений перисинусоїдний набряк.

Візуально міжклітинні простори в даній групі гістологічних препаратів були найбільшими за рахунок інтерстиціального набряку порівняно з препаратами групи порівняння та групи, де виконувалось лише два цикли кріодії. Патоморфологічні зміни в тканині печінки свині свідчать про потенціуючий ефект введення дистильованої H_2O за 5 хв до початку локальної кріодії.

3.5. Результати дослідження процесу локальної кріодії, потенційованого дистильованою H₂O, на моделі безпородних щурів з перещепленою карциномою Герена за збереженого кровотоку (*in vivo*)

Четвертий етап експериментального дослідження – *in vivo*. В підрозділах 3.2–3.3 описано отримані результати експериментальних етапів дослідження, проведених *in vitro*, де було показано, що дистильована H₂O при контакті з пухлинними клітинами карциноми Герена спричиняє виражені дистрофічні зміни в 100 % клітин при тривалості експозиції не менше 5 хв, а при збільшенні даного часу до 10 та 15 хв – ці зміни лише продовжують прогресувати та призводять до необоротного пошкодження клітин.

Доведено також ефективність потенціювання локальної кріодії шляхом попереднього введення дистильованої H₂O в біологічну тканину, на прикладі моделі паренхіматозного органа – печінки свині, за відсутності спланхнічного кровообігу.

Вище наведене диктує необхідність дослідження ефектів локальної дії при введенні в солідну пухлину дистильованої H₂O на експериментальній моделі *in vivo* за збереженого кровотоку.

Метою четвертого етапу експериментального дослідження було отримання відповіді на запитання, чи посилює попереднє введення дистильованої H₂O в солідну пухлину процес локальної кріодії за збереженого кровотоку.

Для досягнення поставленої мети вирішували наступні завдання: вивчити динаміку змін температури на дискретних глибинах у фіксованих точках в пухлинній тканині під час локальної кріодії подвійним циклом без застосування та із застосуванням попереднього введення в тканину дистильованої H₂O; розробити формулу розрахунку об'єму дистильованої H₂O, яку необхідно ввести в солідну пухлину з метою кріопотенціювання; дослідити морфологічні зміни, які відбуваються в пухлинній тканині після двох циклів локальної кріодії без потенціювання дистильованою H₂O та з кріопотенціюванням.

Результати порівняльного аналізу динаміки змін температури на дискретних глибинах в пухлинній тканині за умов збереженого кровотоку при локальній кріодії, потенційованій введенням дистильованої H_2O . До моменту формування дослідних груп з дослідження було загалом виключено 22,5 % (n=9) дослідних тварин.

Причини виключення: негативне перещеплення (n=3); висота пухлини до 12-ї доби від моменту перещеплення менше 20 мм (n=4); ріст пухлини химерної форми та місце її локалізації, відмінне від запланованого, що унеможливило стандартизований підхід до проведення локального кровопливу з термометрією (n=2).

Отже, із 40 щурів, яким виконувалось перещеплення карциноми Герена, відсоток позитивних перещеплень склав 92,5 % (n=37). Із 37 дослідних тварин, у яких було констатовано позитивний ефект перещеплення, у 89,2 % випадків (n=33) висота пухлини до 12-ї доби після перещеплення мала розмір більше 20 мм.

В дослідження було включено 31 дослідну тварину, з яких на 10–12 добу після перещеплення формували дослідні групи таким чином, щоб не було статистично значущої різниці між середньою масою щурів, середнім об'ємом та висотою пухлини в кожній з груп (табл. 3.7).

Таблиця 3.7

Середні значення показників маси щурів (г), висоти пухлини (мм), об'єму пухлини (см³) та їх похибка в ГП та ОГ (підгрупи А, Б та С)

| Показник | Дослідна групи тварин (n=31) | | | | p |
|--------------------------------|------------------------------|----------------|-------------|------------|--------------|
| | група порівняння (n=6) | основна (n=25) | | | |
| | | підгрупа | | | |
| | | А (n=7) | Б (n=8) | С (n=10) | |
| Відсоток тварин, % | 19,35 | 22,60 | 25,80 | 32,25 | |
| Маса тварин, г | 125,2 ± 2,4 | 125,6 ± 2,2 | 128,4 ± 1,8 | 123 ± 2,3 | 0,351 |
| Висота пухлини, мм | 20,8 ± 0,5 | 21,6 ± 0,6 | 21,6 ± 0,4 | 21,9 ± 0,3 | 0,408 |
| Об'єм пухлини, см ³ | 10,3 ± 0,5 | 9,7 ± 0,4 | 11,1 ± 0,5 | 11,1 ± 0,4 | 0,124 |

Таким чином було сформовано 2 групи дослідних тварин: група порівняння – 6 щурів з перещепленою карциномою Герена без будь-якого впливу на пухлину; основна група – 25 щурів. Штангельциркулем з 10-ї до 12-ї доби після перещеплення вимірювали довжину, ширину та висоту пухлини. Об'єм пухлини (V , см^3) визначали за формулою 3.1 [64]

$$V_{п.} = (a \times b \times c) \times 0,52, \quad (3.1)$$

де, $V_{п.}$ – об'єм пухлини в см^3 ; a – довжина пухлини; b – ширина пухлини; c – висота (глибина) пухлини; 0,52 – стала (коефіцієнт Хігедіуса).

ОГ було розподілено на 3 підгрупи: підгрупа А – 7 щурів, у пухлину яких вводили лише дистильовану H_2O ; підгрупа Б – 8 щурів, де проводилась локальна кріодія на пухлину подвійним циклом; підгрупа С – 10 щурів: в пухлину карциноми Герена вводили дистильовану H_2O та через 5 хв проводили 2 цикли локальної кріодії.

Не виявлено достовірної різниці між ГП та А, Б, С підгрупами ОГ за показниками маси щурів, висоти та об'єму пухлини ($p > 0,05$).

Групи є репрезентативними та відрізняються лише за механізмом впливу на пухлину. В доступній вітчизняній та зарубіжній літературі відсутні дані про спосіб розрахунку об'єму дистильованої H_2O , який необхідно ввести в солідну пухлину з метою потенціювання локальної кріодії при кріодеструкції чи кріофіксації. Для розробки формули розрахунку об'єму дистильованої H_2O , який необхідно ввести в солідну пухлину з метою потенціювання локальної кріодії, та яку в подальшому можливо було б застосовувати в клінічній практиці, нами проведено аналіз результатів дослідження в підгрупах А та С на 17 солідних пухлинах перещепленої карциноми Герена ОГ щурів.

Після введення щура в наркоз, розсікали шкіру над пухлиною, останню виділяли по передньо-бокових поверхнях зі збереженням цілісності капсули. Для введення дистильованої H_2O в пухлину застосовували звичайну голку для підшкірних ін'єкцій довжиною 20 мм і діаметром 0,6 мм. Визначали вентральню-дорзальню вісь пухлини та її умовний центр, через який

проводили голку в напрямку до її дорзальної поверхні. Голку вводили в пухлину на глибину 19 мм від її вентральної поверхні.

Перед початком введення дистильованої H_2O в пухлину – виконували часткову аспірацію, шляхом зворотної тракції поршня шприца з метою уникнення потрапляння розчину безпосередньо в судинне русло. У разі відсутності крові в шприці, оцінювали локалізацію голки як таку, що знаходиться в інтерстиціальному просторі пухлини, поза просвітом судинної стінки, що давало можливість розпочинати введення дистильованої H_2O . Повільно протягом 5 хв в пухлину вводили максимально можливий об'єм дистильованої H_2O , виконуючи одночасно тракцію голки в товщі пухлини по дорзально-вентральній осі до її поверхні. Якщо розчин починав масивно затікати за контури капсули пухлини в операційну рану або витікати з місця пункції – припиняли введення та фіксували об'єм розчину, який було введено.

Середній об'єм пухлини ($V_{п.}$, $см^3$) дослідних тварин ($n=17$) підгрупи А та С становив $10,54$ $см^3$ (95 % ВІ: 9,86–11,21). Середній об'єм дистильованої H_2O ($V_{д.в.}$, $мл^3$), введеної в пухлину склав $4,0$ $мл^3$ (95 % ВІ: 3,7–4,2). При порівнянні середніх значень $V_{п.}$ та $V_{д.в.}$ виявлено достовірну різницю на рівні значущості $p < 0,001$. У відсотковому співвідношенні в експерименті на моделі карциноми Герена білих безпородних щурів максимальний середній $V_{д.в.}$, що був введений в солідну пухлину, склав 38 % від $V_{п.}$. Таким чином, нами було виведено коефіцієнт (К), який становить 3,8. Останній ми застосували у формулі розрахунку об'єму дистильованої H_2O , необхідної для введення в солідну пухлину з метою потенціювання процесу локальної кріодії (кріофіксації, кріодеструкції).

Отже, з метою введення в солідну пухлину дистильованої H_2O , необхідний її об'єм можна розраховувати за наступною розробленою формулою 3.2:

$$V_{д.в.} = V_{п.} \times 0,38 \quad , \quad (3.2)$$

де $V_{д.в.}$ – об'єм дистильованої H_2O ($мл^3$); $V_{п.}$ – об'єм пухлини ($см^3$); 0,38 – коефіцієнт (К), що визначений експериментально.

Динаміку змін температури в пухлині на дискретних глибинах (3, 8, 13 та 18 мм) від робочої поверхні кріоаплікатора визначали за допомогою КВІТ-4, а процес низькотемпературної локальної кріодії здійснювали, як і в попередніх етапах експерименту – універсальною кріохірургічною установкою «Кріо-Пульс» (рис. 3.22).

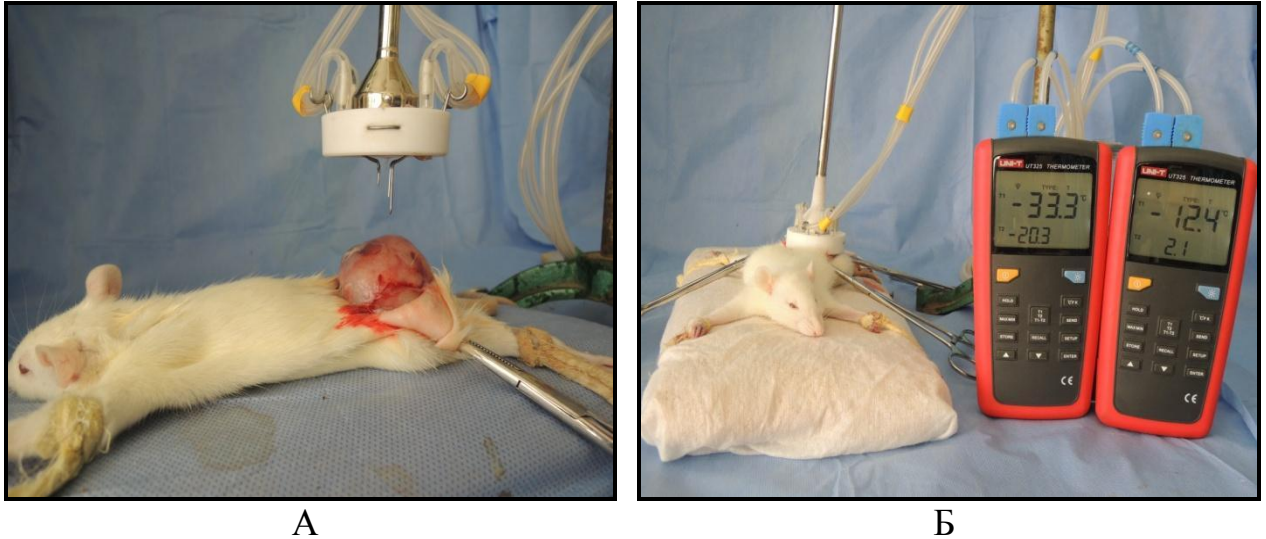


Рис. 3.22. Процес локальної кріодії перевитої карциноми Герена: А – етап встановлення 4-х термопар КВІТ-4 в солідну пухлину дослідного щура; Б – загальний вигляд процесу локальної кріодії перевитої карциноми Герена дослідного щура апаратом «Кріо-Пульс» з інтраопераційним вимірюванням температури на дискретних глибинах (3, 8, 13 та 18 мм) КВІТ-4.

Застосовували кріоаплікатор діаметром 20 мм та температурою робочої поверхні -180°C , час експозиції кріодії складав 5 хв. Кріодеструкцію виконували подвійним циклом з наступним спонтанним відтаванням після завершення 5-ї хв кріодії кожного циклу заморозки як у поєднанні з кріопотенціюванням дистильованою H_2O , так і без. Видалену пухлину поміщали в ємність з 10 % розчином формаліну для подальшого дослідження морфологічних змін. Результати 4-го етапу експерименту наведені в таблицях 3.8 та 3.9 [112], а графічне зображення динаміки змін температури за показниками T1, T2, T3 та T4 КВІТ-4 представлено у вигляді ізотерм (рис. 3.23, 3.24).

Таблиця 3.8

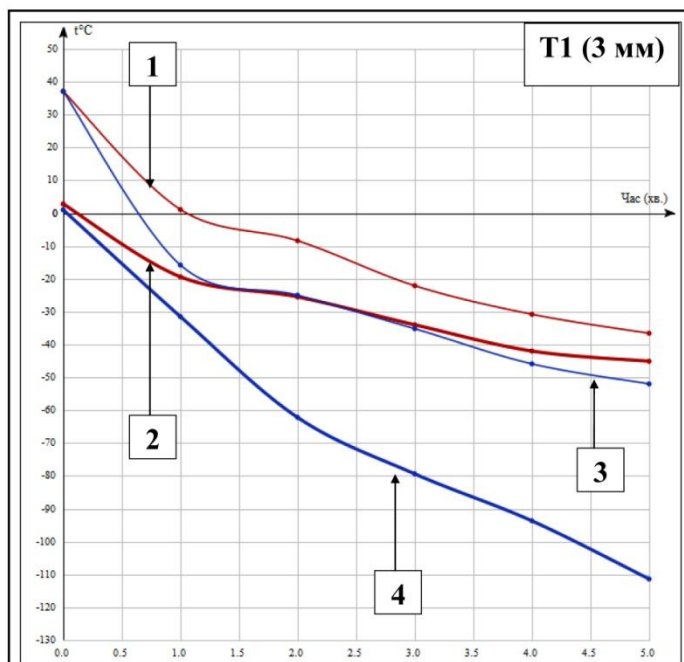
Динаміка зниження температур під час локальної кріодії подвійним циклом (один цикл – 5 хв) зі спонтанним відтаванням на дискретних глибинах у пухлині карциноми Герена щурів підгрупи Б (*in vivo*) на глибині 3, 8, 13 та 18 мм від робочої поверхні кріоаплікатора Ø 20 мм за показниками термопар Т1, Т2, Т3 та Т4 КВІТ-4 (середнє значення (М) та похибка середнього(м))

| Цикл заморозки | | Перший цикл заморозки | | | | Другий цикл заморозки | | | |
|------------------------|---|-----------------------|------------|------------|-------------|-----------------------|-------------|------------|-------------|
| Номер термопар | | Т1 (3 мм) | Т2 (8 мм) | Т3 (13 мм) | Т4 (18 мм) | Т1 (3 мм) | Т2 (8 мм) | Т3 (13 мм) | Т4 (18 мм) |
| Хвилина кріодеструкції | 0 | 37,1 (0,05) | 37,4 (0,1) | 37,5 (0,1) | 38 (0,3) | 2,8 (0,8) | 1,0 (0,4) | 2,0 (0,5) | 8 (0,75) |
| | 1 | 1,1 (0,75) | 16,8 (1,1) | 24,7 (0,8) | 31,4 (0,9) | -19,4 (0,3) | -6,7 (1,3) | -2,0 (0,7) | 1,0 (0,4) |
| | 2 | -8,4 (0,4) | 11,5 (0,9) | 18,0 (1,2) | 24,8 (0,7) | -25,5 (1,1) | -9,2 (1,4) | -3,8 (0,8) | -0,1 (0,5) |
| | 3 | -22,1 (0,4) | 5,3 (0,5) | 13,4 (0,8) | 17,9 (0,25) | -34,0 (1,3) | -12,4 (2,1) | -5,6 (1,0) | -1,5 (0,45) |
| | 4 | -30,8 (0,4) | -4,6 (0,8) | 4,3 (0,9) | 10,3 (0,4) | -42,0 (0,7) | -14,6 (2,6) | -7,1 (1,2) | -2,3 (0,5) |
| | 5 | -36,6 (0,7) | -7,2 (1,0) | 1,0 (0,5) | 7,1 (1,0) | -45,1 (0,9) | -17,5 (3,0) | -8,7 (1,4) | -2,6 (0,6) |

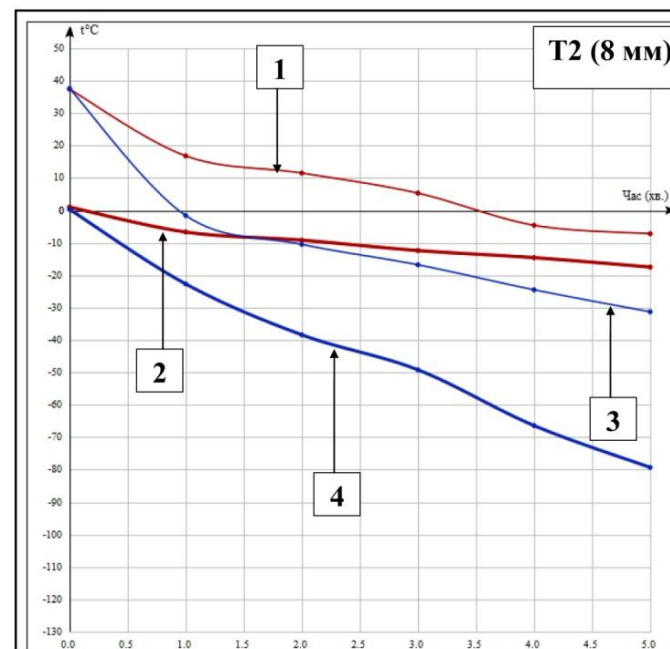
Таблиця 3.9

Динаміка зниження температур у пухлині карциноми Герена щурів підгрупи С (*in vivo*), яким попередньо ввели в пухлину дистильовану Н₂О з наступною локальною кріодією подвійним циклом (один цикл – 5 хв) та спонтанним відтаванням на дискретних глибинах (3, 8, 13 та 18 мм) від робочої поверхні кріоаплікатора Ø 20 мм за показниками термопар Т1, Т2, Т3 та Т4 КВІТ-4 (середнє значення (М), похибка середнього (m))

| Цикл заморозки | | Перший цикл заморозки | | | | Другий цикл заморозки | | | |
|------------------------|---|-----------------------|-------------|-------------|------------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| Номер термопар | | Т1 (3 мм) | Т2 (8 мм) | Т3 (13 мм) | Т4 (18 мм) | Т1 (3 мм) | Т2 (8 мм) | Т3 (13 мм) | Т4 (18 мм) |
| Хвилина кріодеструкції | 0 | 37,1 (0,06) | 37,6 (0,1) | 38,2 (0,3) | 38,8 (0,3) | 1,0 (0,1) | 0,3 (0,1) | 0,4 (0,06) | 2,4 (0,5) |
| | 1 | -15,8 (0,6) | -1,6 (1,4) | 4,3 (1,5) | 12,5 (1,5) | -31,5 (0,6) | -22,7 (1,2) | -11,4 (0,7) | -6,3 (0,5) |
| | 2 | -25,0 (0,7) | -10,5 (1,0) | -1,7 (1,4) | 6,2 (1,2) | -62,2 (1,3) | -38,4 (1,2) | -23,1 (0,9) | -11,7 (0,7) |
| | 3 | -35,2 (0,9) | -16,8 (1,4) | -7,4 (1,5) | 0,1 (0,8) | -79,4 (1,3) | -49,2 (1,0) | -34,3 (1,5) | -17,4 (0,7) |
| | 4 | -45,9 (1,1) | -24,5 (1,1) | -12,2 (1,4) | -4,3 (0,5) | -93,7 (1,1) | -66,4 (1,6) | -44,5 (1,0) | -20,5 (1,2) |
| | 5 | -52,0 (1,0) | -31,3 (0,9) | -20,0 (1,6) | -8,1 (0,9) | -111,4 (2,1) | -79,3 (1,9) | -62,9 (2,0) | -22,5 (1,3) |



А

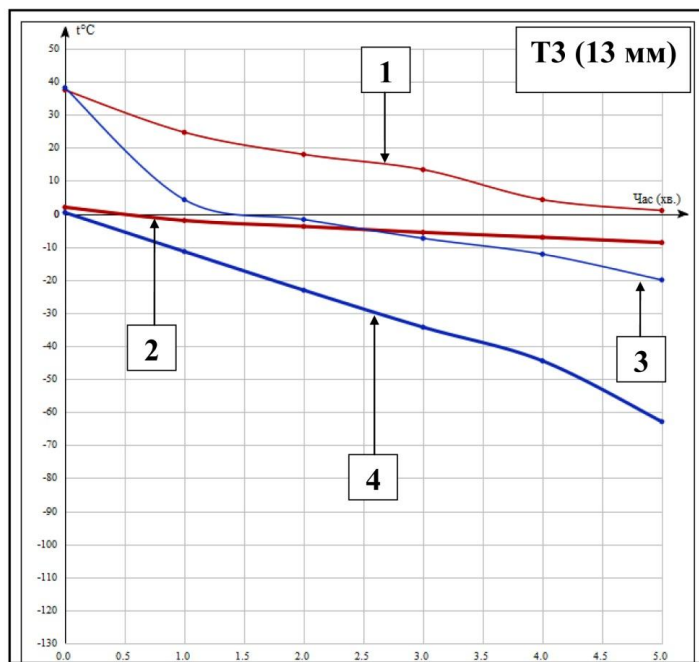


Б

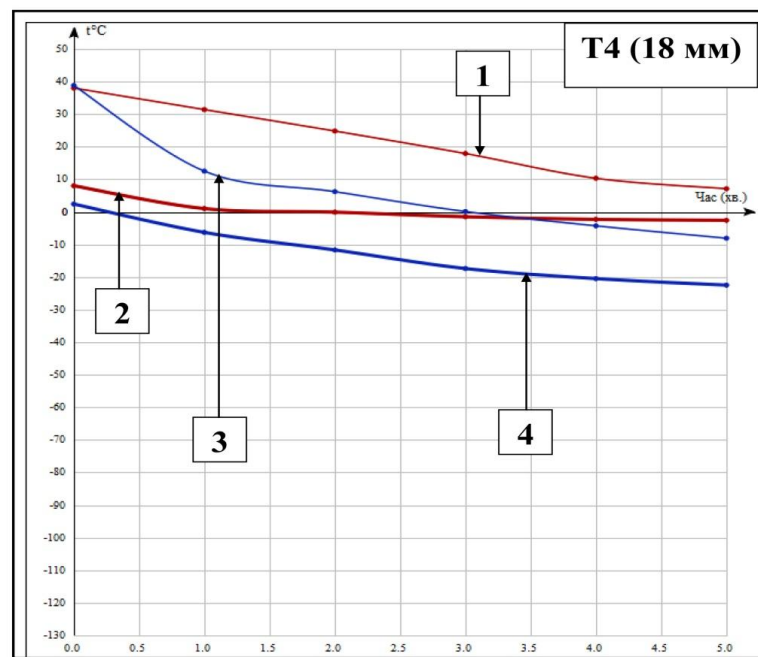
Рис. 3.23. Графічне зображення динаміки зниження температури в пухлині карциноми Герена (*in vivo*) подвійним циклом заморозки без кріопотенціювання та з потенціюванням дистильованою H_2O : 1 – крива динаміки зниження температур без кріопотенціювання (перший цикл заморозки); 2 – крива динаміки зниження температур без кріопотенціювання (другий цикл заморозки); 3 – крива динаміки зниження температур з потенціюванням дистильованою H_2O (перший цикл заморозки); 4 – крива динаміки зниження температур з потенціюванням дистильованою H_2O (другий цикл заморозки):

А – за показником терморпари Т1 на глибині 3 мм від поверхні кріоаплікатора;

Б – за показником терморпари Т2 на глибині 8 мм від поверхні кріоаплікатора



А



Б

Рис. 3.24. Графічне зображення динаміки зниження температури в пухлині карциноми Герена (*in vivo*) подвійним циклом заморозки без кріопотенціювання та з потенціюванням дистильованою H_2O : 1 – крива динаміки зниження температур без кріопотенціювання (перший цикл заморозки); 2 – крива динаміки зниження температур без кріопотенціювання (другий цикл заморозки); 3 – крива динаміки зниження температур з потенціюванням дистильованою H_2O (перший цикл заморозки); 4 – крива динаміки зниження температур з потенціюванням дистильованою H_2O (другий цикл заморозки):

А – за показником термопари Т3 на глибині 13 мм від поверхні кріоаплікатора;

Б – за показником термопари Т4 на глибині 18 мм від поверхні кріоаплікатора.

Експеримент носив гострий характер. Після видалення пухлини в ГП щурів та ОГ виконували евтаназію тварин з дотриманням принципів «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 18 березня 1986 р.).

Отже, за показниками термопари Т3 (13 мм) та за показниками термопари Т4 (18 мм) відмічається, що середня температура з 1-ї та до 5-ї хв включно впродовж періоду заморозки першого циклу локальної кріодії не досягає мінусових значень на відміну від відповідних термограм, де застосовувалось кріопотенціювання дистильованою H_2O [112].

При порівнянні значень середньої температури в пухлині карциноми Герена на дискретних глибинах (3, 8, 13 та 18 мм) за показниками термопар Т1–Т4 КВІТ-4 під час локальної кріодії, починаючи з 1-ї та до 5-ї хв включно, досягались достовірно нижчі показники температур в підгрупі С (n=10) як під час першого, так і другого періоду заморожування порівняно з підгрупою В (n=8) на рівні значущості $p < 0,001$ [13, 22].

Введення в пухлину дистильованої H_2O за 5 хв до початку локального кріовпливу на експериментальній моделі перещепленої карциноми Герена у безпородних щурів за збереженого інтратуморального кровотоку чинить потенціюючий ефект, який проявляється в досягненні показників середньої температури в діапазоні мінусових значень на всіх дослідних глибинах (3, 8, 13, 18 мм) за показниками термопар Т1–Т4 КВІТ-4.

Морфологічні зміни в пухлинній тканині карциноми Герена після локальної кріодії подвійним циклом заморозки з потенціюванням дистильованою H_2O та без такого. Гістологічні препарати готували за стандартизованою методикою. В групі порівняння та основній групі щурів видаляли пухлину. Отриманий матеріал фіксували в забуференому 10 % розчині формаліну з рН 7,4 на одну годину, а потім проводили по спиртах: 96° спирт на 40 хв, 10 % розчин ізопропілового спирту на 110 хв, ущільнювали в парафіні 120 хв із застосуванням гістіопроектора Histos-5 («Milestone», Італія). З парафінових блоків виготовляли гістологічні зрізи товщиною 5 мкм

за допомогою мікротома Microm HM325 («ThermoScientific», Німеччина). Зрізи забарвлювали гематоксиліном і еозином. Отримані препарати рутинно вивчали за допомогою мікроскопа OLYMPUS CX 41.

З метою порівняння патоморфологічних змін, що виникають в пухлинній тканині карциноми Герена після локальної кріодії подвійним циклом заморозки без потенціювання дистильованою H_2O та з попереднім потенціюванням, в якості контролю спочатку досліджували зразки гістологічних препаратів пухлини (рис. 3.25) без будь-яких локальних фізико-хімічних впливів у групі порівняння щурів ($n=6$).

Додатково було вивчено характер патоморфологічних змін у пухлинній тканині карциноми Герена підгрупи А ($n=7$) основної групи дослідних щурів, в пухлину яких вводили лише дистильовану H_2O без проведення локальної кріодії (див. рис. 3.26). На рисунку 3.26 червоною пунктирною лінією умовно розмежовані ділянки зрізу пухлинної тканини, яка перебувала в контакті з дистильованою H_2O (час експозиції контакту – 5 хв) з необоротними деструктивними змінами (1) та ділянками тканини, де візуалізуються життєздатні пухлинні клітини та клітини з явищами гідропічної дистрофії.

Пухлинна тканина карциноми Герена, що представлена поліморфними гіперхромними клітинами, переважно великого розміру, з компактним розміщенням одна відносно одної у вигляді тяжів. Ядра клітин чітко візуалізуються у вигляді ексцентричних структур з грубодисперсним хроматином. Цитоплазма має виражене базофільне забарвлення.

На прикладі мікрофотографії (див. рис. 3.26), можна зробити висновок, що при введенні в солідну злоякісну пухлину на моделі перещеплюваної карциноми Герена у білих безпородних щурів, розрахованого за формулою об'єму дистильованої H_2O , остання розподіляється в тканині нерівномірно. У тих ділянках, де пухлинні клітини перебували в контакті з дистильованою H_2O більшою площею поверхні своєї мембрани – через 5 хв після введення встигали розвинути необоротні деструктивні зміни (каріорексис, розриви

цитоплазматичної мембрани, поєднання каріорексису та розриву цитоплазматичної мембрани).

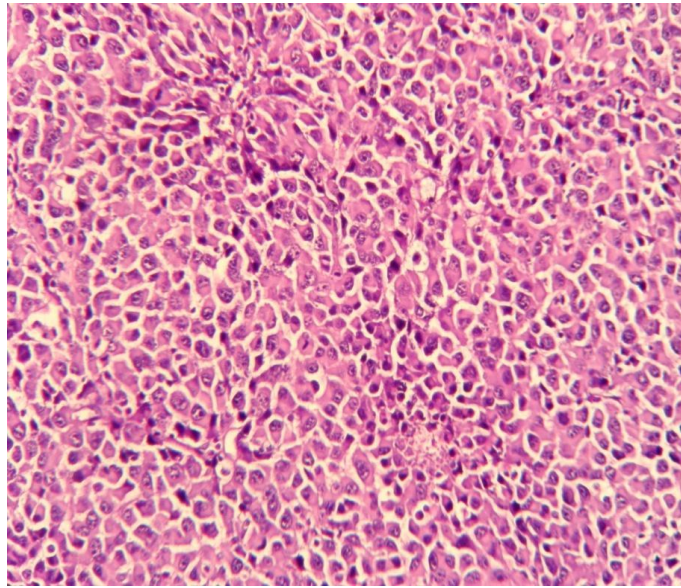


Рис. 3.25. Пухлинна тканина карциноми Герена без будь-яких фізико-хімічних впливів (група порівняння щурів).

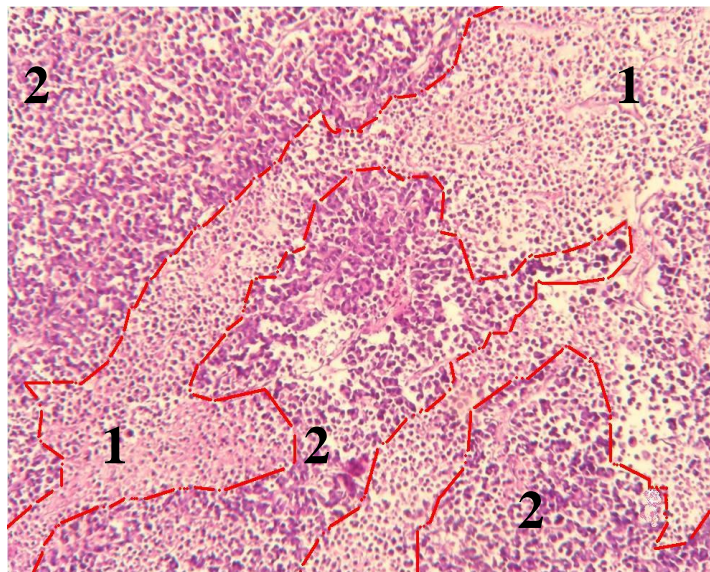
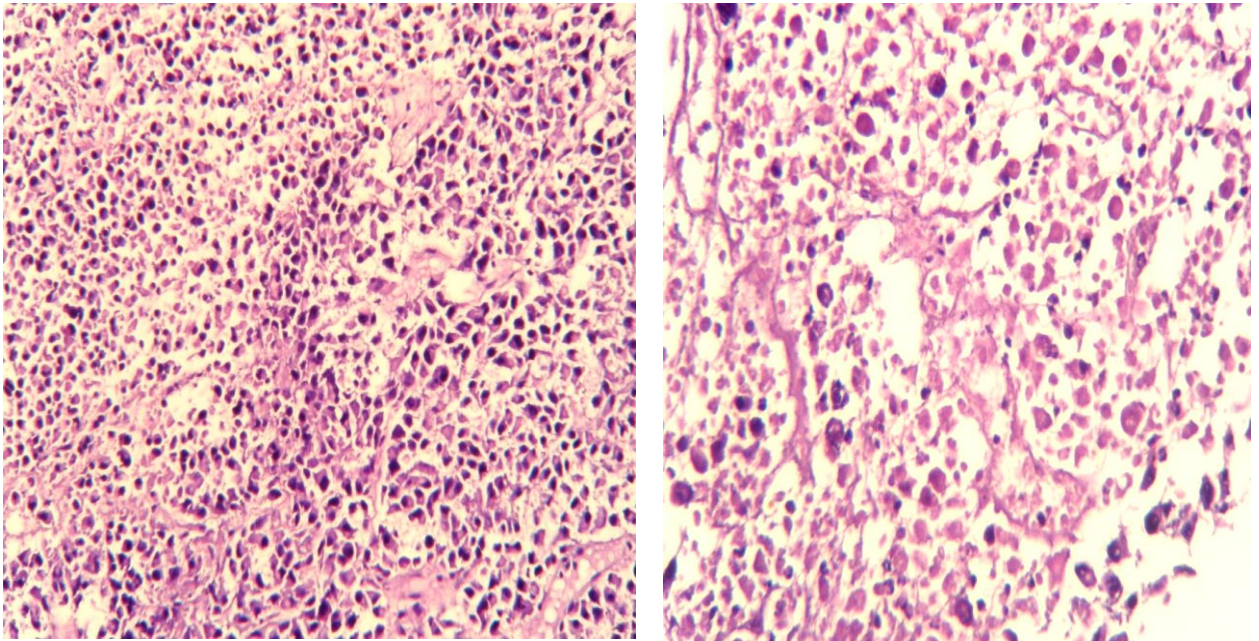


Рис. 3.26. Пухлинна тканина через 5 хв після введення в карциному Герена дистильованої H_2O : 1 – осередки тканини з необоротними деструктивними змінами пухлинних клітин; 2 – осередки пухлинної тканини, де зустрічаються життєздатні клітини та клітини з ознаками гідропічної дистрофії.

В інших ділянках пухлинної тканини, де контакт з дистильованою H_2O відбувся з меншою кількістю пухлинних клітин або з меншою площею поверхні їх цитоплазматичної мембрани, за 5 хв експозиції розвивались зміни

по типу гідропічної дистрофії. Міжклітинні проміжки збільшувались за рахунок інтерстиціального набряку. Вважаємо, що це явище є не лише наслідком гідратації пухлини безпосередньо дистильованою H_2O , але і виходом цитоплазми зі значної кількості клітин, де було пошкоджено цитоплазматичну мембрану внаслідок «осмотичного шоку». Інтерстиціальний набряк тканини після введення в останню дистильованої H_2O – це одна з важливих ознак, що впливає на зміну теплофізичних властивостей тканини, а саме – підвищує холодопровідність під час локальної кріодії.

У підгрупі В (n=8) основної групи дослідних щурів, де проводили два цикли локальної кріодії на пухлинну тканину карциноми Герена (рис. 3.27А), в матеріалі гістологічних препаратів відмічались патоморфологічні зміни як серед паренхіматозних елементів (пухлинні клітини), так і стромальних елементів.



А

Б

Рис. 3.27. Пухлинна тканина карциноми Герена (час експозиції періоду заморозки кожного циклу – 5 хв, відтавання – спонтанне): А – після двох циклів локальної кріодії, Б – після введення дистильованої H_2O та двох циклів локальної кріодії.

Однак, серед пухлинних клітин з пікнотично зміненими ядрами, цитолізом, ділянками дезорганізації стромальних елементів візуалізувались

пухлинні клітини без ознак необоротного первинного кріпошкодження. При дослідженні патоморфологічних змін у пухлинній тканині карциноми Герена дослідних щурів підгрупи С (n=9), де за 5 хв до початку локальної кріодії в пухлину вводили дистильовану H_2O та проводили два цикли заморозки по 5 хв зі спонтанним відтаванням (рис. 3.27Б) нами було виявлено найбільші патоморфологічні зміни.

В полі зору препарату (див. рис. 3.27Б) життєздатні пухлинні клітини не візуалізувались. Тканина представлена некротичними масами з вираженим інтерстиціальним набряком, дезорганізацією волокон строми пухлини. Більшість пухлинних клітин втратили структуру і форму, яку можна описати поняттям «клітина». На фоні вираженого набряку інтерстиціального простору візуалізувались клітинні елементи, що були наслідками цитоклазії, каріолізу зі слабобазофільним забарвленням. Візуально міжклітинні простори в гістологічних препаратах пухлини дослідних щурів підгрупи С були найбільшими за рахунок інтерстиціального набряку в порівнянні з препаратами групи порівняння щурів та підгрупи А та В основної групи.

Висновки

1. Введена в солідну злоякісну пухлину за 5 хв до початку локальної кріодії дистильована H_2O , на прикладі експериментальної моделі перещепленої карциноми Герена у білих безпородних щурів за умови збереженого інтратуморального кровотоку, розподіляється в тканині нерівномірно та неоднорідно викликає необоротні деструктивні зміни в пухлинних клітинах.

2. Попереднє введення в солідну злоякісну пухлину дистильованої H_2O за 5 хв до початку локальної кріодії подвійним циклом заморозки зі спонтанним відтаванням чинить потенціюючий ефект, що проявляється в повній деструкції пухлинних клітин в заданому об'ємі тканини.

Основні положення розділу 3 показано в працях автора [13], [21], [22], [55], [56], [83].

РОЗДІЛ 4

**ДІАГНОСТИКА ТА ХІРУРГІЧНЕ ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ З
РЕЗЕКТАБЕЛЬНОЮ СОЛІДНОЮ ЗЛОЯКІСНОЮ ПУХЛИНОЮ
ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ В ГРУПІ ПОРІВНЯННЯ (Р)**

В групу порівняння (Р) в період 2010–2015 рр. було включено 46 хворих: чоловіки – 23 (50,0 %), жінки – 23 (50,0 %). Середній вік хворих складав $(58,4 \pm 1,7)$ роки (95 % ВІ: 55–61,8): чоловічої статі – $(54,1 \pm 2,5)$ (95 % ВІ: 48,8–59,4), жіночої – $(62,7 \pm 1,8)$ (95 % ВІ: 59–66,4). Достовірно вищим був середній вік жінок, ніж чоловіків на рівні значущості, $p=0,009$.

У проксимальному відділі ПЗ (головка) солідна резектабельна пухлина локалізувалась у 35 (76,1 %) хворих, у дистальному відділі – в 11 (23,9 %); частота локалізації в головці ПЗ переважала над локалізацією в дистальних відділах (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

**Розподіл хворих на РПЗ за статтю залежно від локалізації солідної
пухлини в ПЗ відносно її відділів**

| Стать | Локалізація пухлини, n (%) | | Всього, n (%) |
|-----------|-----------------------------------|---|---------------|
| | проксимальний відділ ПЗ (головка) | дистальний відділ ПЗ (тіло, хвіст, на межі тіла-хвоста) | |
| Чоловіки, | 20 (43,5) | 3 (6,5) | 23 (50,0) |
| Жінки | 15 (32,6) | 8 (17,4) | 23 (50,0) |
| Разом | 35 (71,6) | 11 (23,9) | 46 (100,0) |

При порівняння хворих з локалізацією пухлини в проксимальному відділі ПЗ з хворими, у яких пухлина локалізувалась у дистальному відділі ПЗ, використовували критерій χ^2 .

Було встановлено, що $\chi^2_{\text{факт.}}=1,91$, число ступенів вільності $k=1$. Різниця між групами не є достовірною на рівні значущості, $p=0,167$.

Як видно з даних (див. табл. 4.1), у хворих чоловічої статі частота проксимальної локалізації РПЗ переважає і складає 43,5 % проти 35,6 % у жінок.

Серед променевих методів діагностики застосовували МРПХГ, МСКТ ОЧП та їх комбінацію. МРПХГ в групі (Р) було застосовано в 67,4 % (в 31 хворого з 46). МСКТ було застосовано в 63,0 % хворих (29 з 46). Поєднане застосування МРПХГ та МСКТ виконувалось у 30,4 % хворих на резектабельний РПЗ. При порівнянні частоти застосування МРПХГ, МСКТ та їх поєднання у хворих на резектабельний РПЗ залежно від локалізації пухлини в проксимальному та дистальному відділі ПЗ використано критерій χ^2 . Змінні приймають 3 рівні значення. χ^2 факт.=0,48, число ступенів вільності $k=2$. Різниця не є достовірною на рівні значущості, $p=0,786$ (табл. 4.2–4.4).

З метою оптимізації методу криофіксації при хірургічному лікуванні хворих на НЗПЗ та плануванні вибору діаметра криоаплікатора, режиму локальної криодії при формуванні групи порівняння хворих (К+Р) – нами ретроспективно було проведено визначення об'єму пухлини за даними МСКТ та МРПХГ в групі (Р), що представлено на рисунку 4.1.

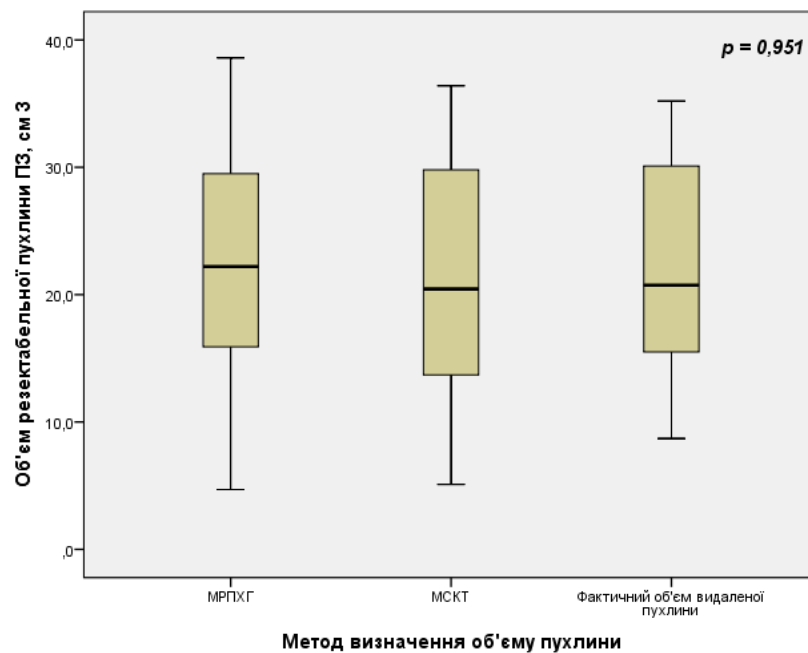


Рис. 4.1. Порівняльний аналіз фактичного об'єму видаленої пухлини ПЗ з об'ємом за даними МРПХГ та МСКТ.

Таблиця 4.2

Характеристика застосування МРПХГ у хворих на резектабельний РПЗ залежно від локалізації пухлини в проксимальному та дистальному відділах ПЗ

| Метод діагностики МРПХГ | Локалізація пухлини, n (%) | | Всього, n (%) |
|-------------------------|-----------------------------------|---|---------------|
| | проксимальний відділ ПЗ (голівка) | дистальний відділ ПЗ (тіло, хвіст, на межі тіла-хвоста) | |
| Так | 23 (50,0) | 8 (17,4) | 31 (67,4) |
| Ні | 12 (26,1) | 3 (6,5) | 15 (32,6) |
| Разом | 35 (76,1) | 11 (23,9) | 46 (100,0) |

Таблиця 4.3

Характеристика застосування МСКТ у хворих на резектабельний РПЗ залежно від локалізації пухлини в проксимальному та дистальному відділах ПЗ

| Метод діагностики МСКТ | Локалізація пухлини, n (%) | | Всього, n (%) |
|------------------------|-----------------------------------|---|---------------|
| | проксимальний відділ ПЗ (голівка) | дистальний відділ ПЗ (тіло, хвіст, на межі тіла-хвоста) | |
| Так | 21 (45,7) | 8 (17,4) | 29 (63,0) |
| Ні | 14 (30,4) | 3 (6,5) | 17 (37,0) |
| Разом | 35 (76,1) | 11 (23,9) | 46 (100,0) |

Таблиця 4.4

Характеристика застосування методів променевої діагностики (МРПХГ + МСКТ) у хворих на резектабельний РПЗ залежно від локалізації пухлини в проксимальному та дистальному відділах ПЗ

| Метод діагностики МРПХГ+ МСКТ | Локалізація пухлини, n (%) | | Всього, n (%) |
|-------------------------------|-----------------------------------|---|---------------|
| | проксимальний відділ ПЗ (голівка) | дистальний відділ ПЗ (тіло, хвіст, на межі тіла-хвоста) | |
| Так | 9 (19,6) | 5 (10,9) | 14 (30,4) |
| Ні | 26 (56,5) | 6 (13,0) | 32 (69,6) |
| Разом | 35 (76,1) | 11 (23,9) | 46 (100,0) |

За даними МРПХГ, середній об'єм пухлини ($V_{п.}$, см^3) загалом у групі (Р) складав $(18,7 \pm 1,8) \text{ см}^3$ (95 % ВІ: 15–22,4 см^3). За даними МСКТ ОЧП, середній $V_{п.}$ склав $23,3 \text{ см}^3$ (95 % ВІ: 19,4–27,1 см^3). При порівнянні середніх значень двох незалежних вибірок (МРПХГ та МСКТ) між собою, використовували критерій Ст'юдента, оскільки розподіл не відрізнявся від нормального. Об'єм вибірок: МРПХГ ($n=31$), МСКТ ($n=29$). $T=1,75$, число ступенів вільності $k=58$. Було встановлено, що різниця середнього $V_{п.}$ за даними МРПХГ порівняно з МСКТ не є достовірною, на рівні значущості, $p=0,085$.

Окремо проведено порівняння $V_{п.}$ в групі хворих ($n=14$), де одночасно застосовували два види променевої діагностики (МРПХГ + МСКТ), з фактичним об'ємом пухлини, який визначали макроскопічно після видалення пухлини. Порівняльний аналіз $V_{п.}$ представлено у вигляді box-plot на рисунку 4.1. Характеристику box-plot на можна доповнити наступними даними: середній $V_{п.}$ за даними МРПХГ складав $(22,4 \pm 2,9) \text{ см}^3$ (95 % ВІ: 16,2–28,5 см^3); $V_{п.}$ за даними МСКТ – $(21,2 \pm 2,8) \text{ см}^3$ (95 % ВІ: 15,1–27,3); фактичний об'єм видаленої пухлини – $(21,8 \pm 2,3) \text{ см}^3$ (95 % ВІ: 16,9–26,7).

За методом дисперсійного аналізу для множинних порівнянь 3 вибірок було встановлено, що $V_{п.}$ за даних МРПХГ та МСКТ достовірно не відрізняється від фактичного об'єму видаленої пухлини на рівні значущості, $p=0,951$.

Додатково в групі порівняння (Р) визначали ЦПК в крові, ІПК в перитонеальних змивах та циркулюючу пухлинну ДНК (цпДНК) з KRAS-мутацією з метою визначення можливості їх застосування як додаткового маркера безпосереднього контролю проведеної криофіксації.

Діагностика ЦПК, ІПК та цпДНК у хворих з резектабельною протоковою аденокарциномою ПЗ. На 1-му етапі дослідження (2010–2015 рр.) у пацієнтів групи порівняння (Р), у яких виконували лише класичний варіант резекції ПЗ (ПДР, ДР), визначали ЦПК в крові, ІПК в перитонеальних змивах та ідентифікували циркулюючу пухлинну ДНК (цпДНК) в зразках плазми крові з попереднім визначенням KRAS-мутації.

Проведення цитологічних, імуноцитохімічних та молекулярно-генетичних досліджень у радикально оперованих хворих групи порівняння (Р) 1-го етапу дослідження було зумовлене необхідністю пошуку додаткового «інструмента» безпосереднього контролю ефективності виконання кріофіксації резектабельної солідної злоякісної пухлини ПЗ у групі порівняння (К+Р), набір якої планувався.

Було висунуто припущення, що у хворих, яким виконується лише класичний варіант резекції ПЗ, частота виявлення ЦПК в крові, ІПК в змивах з очеревини та кількість цпДНК в зразках плазми крові будуть зростати після проведення етапу мобілізації ПЗ, унаслідок виконання пальпаторно-тракційних маніпуляцій з пухлиною. Для спростування або підтвердження цієї гіпотези в групі порівняння (Р) діагностику ЦПК в крові проведено у 24 радикально оперованих хворих, що склало 52,2 % від загальної кількості (n=46) включених у 1-й етап дослідження хворих. У 22 (47,8 %) хворих групи порівняння (Р) визначали ІПК в змивах з очеревини відразу після лапаротомії та наприкінці операції перед ушиванням лапаротомної рани. У 10 (21,74 %) хворих визначали наявність KRAS-мутації в гістологічному препараті пухлини ПЗ. У 7 (70 %) хворих з 10-ти було виявлено KRAS-мутацію; у подальшому саме в цій групі вивчали динаміку зміни концентрації цпДНК методом ПЛР зразків плазми крові, що забиралась до, під час та після операції.

Методика та результати дослідження ЦПК в крові хворих з резектабельним РПЗ. ЦПК в групі порівняння (Р) досліджували в 16 (34,8 %) хворих з локалізацією пухлини в проксимальному відділі та у 8 (17,4 %) – в дистальному відділі ПЗ. Середній вік хворих складав ($60,6 \pm 2$) роки (95 % ВІ: 56,4–64,9 роки). Розподіл за статтю не відрізнявся: частота хворих чоловічої статі складала 12 (50 %), жіночої – 12 (50 %). У всіх хворих діагноз морфологічно верифіковано – ПАПЗ в 100,0 %. На передопераційному етапі визначали онкомаркери СА 19-9 та РЕА: медіана СА 19-9 склала ($198,2 \pm 78,8$) Од/мл (95 % ВІ: 114,5–312 Од/мл); середній

рівень РЕА – $(3,0 \pm 0,5)$ нг/мл (95 % ВІ: 1,9–4,3). Тип резекції ПЗ, виконаний у 24 хворих, у яких досліджували ЦПК, представлено у вигляді діаграми (рис. 4.2).

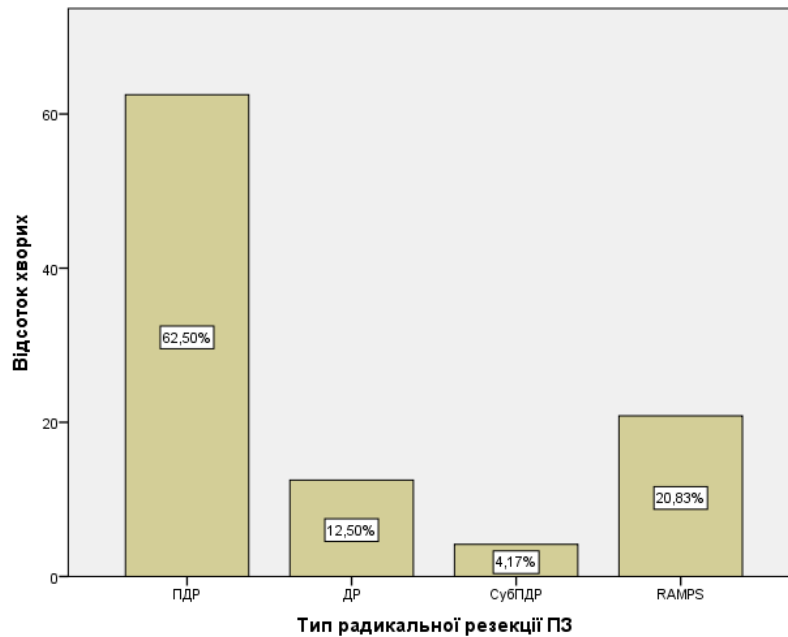


Рис. 4.2. Характеристика радикальної резекції ПЗ у групі хворих (n=24), де досліджували ЦПК.

За даними, представленими на діаграмі, можна спостерігати переважання проксимальних резекцій залози (66,7 %) над дистальними (33,3 %), унаслідок частішої локалізації пухлини в головці ПЗ.

Алгоритм забору зразків крові для дослідження ЦПК був наступний:

- 1-й забір крові виконували в день операції з центральної вени до лапаротомії (центральний венозний доступ встановлювали у всіх без винятку хворих за добу до операції);
- 2-й забір крові виконували після повної мобілізації пухлини, незалежно від типу резекції залози, шляхом пункції ділянки порто-мезентеріально конфлюенсу з наступною аспірацією крові звичайною голкою для ін'єкцій, втім варто зазначити, що в групі (Р) оперативні втручання виконували в класичному варіанті (без попередньої кріофіксації);
- 3-й забір крові виконували з центральної вени наприкінці операції, після ушивання лапаротомної рани (табл. 4.5).

Таблиця 4.5

**Дослідження ЦПК у хворих групи (Р) залежно від локалізації пухлини
у проксимальному та дистальному відділах ПЗ**

| Дослідження ЦПК | Локалізація пухлини, n (%) | | Всього, n (%) |
|--------------------|---|---|---------------|
| | проксимальний відділ ПЗ (голівка) | дистальний відділ ПЗ (тіло, хвіст, на межі тіла-хвоста) | |
| Досліджували | 16 (34,8) | 8 (17,4) | 24 (52,2) |
| Не досліджували | 19 (41,3) | 3 (6,5) | 22 (47,8) |
| Разом | 35 (76,1) | 11 (23,9) | 46 (100,0) |

Методика виявлення ЦПК в крові хворого з резектабельним РПЗ була заснована на принципі приготування імуноцитоблоків. Зразки периферичної крові відстоювали у пробірках при $t=4$ °С протягом 16 год. Надосадову рідину аспірували, осад ресуспендували, розливали у форми 24x24x5 мм та заливали розплавленим агаром. Після застигання агар з розміщеним у ньому осадом переносили в гістологічні касети. Матеріал у касетах фіксувався в розчині оцтовокислого цинк-формаліну протягом 24 год при температурі 37 °С з постійним перемішуванням магнітною мішалкою. Після цього матеріал проводився через ізопропіловий спирт і просочувався парафіном у напівавтоматичному гістопроесорі Milestone Histos 5 (Італія). Залиті в парафін блоки різали на ротаційному мікротомі Hestion ERM 3000 (Австралія). Зрізи товщиною 4 мкм розміщували на предметні скельця Menzel Super Frost (Німеччина) для забарвлення гематоксилином і еозином та на адгезивні скельця Menzel Super Frost (Німеччина) для забарвлення імуногістохімічним методом. Зразки периферичної крові забарвлювали імуногістохімічно на загальні цитокератини і раковомембрональний антиген (PEA). Використовували антитіла до загальних цитокератинів (клон AE1/AE3, DAKO, Данія), моноклональні антитіла до раковомембронального антигену (клон П-1, DAKO, Данія). Відновлення антигенності тканин виконували в автоматичній водяній бані DAKO PT-Module (Данія). Візуалізацію первинних антитіл виконували за допомогою системи візуалізації DAKO Flex+ High pH (Данія). Забарвлені зрізи заключали під покривне скло у покривне середовище.

Досліджували препарати у мікроскопі ERMA EZ 122T. Для підрахунку позитивних клітин препарати фотографували за допомогою цифрової камери, на знімках за допомогою програми JMicroVision 1.2.7 шляхом мануального підрахунку позитивних і негативних об'єктів.

За описаною методикою було проаналізовано 72 цитоблоки, виготовлених із забраних зразків крові від 24 пацієнтів групи (Р).

В жодному з цитоблоків ЦПК не були виявлені ані звичайним цитологічним методом, ані при імуногістохімічному забарвленні.

Масивний інтраопераційний перитонеальний лаваж та діагностика ІПК в перитонеальних змивах хворих на ПАПЗ. Клінічне значення ІПК в перитонеальних змивах радикально оперованих хворих з резектабельним РПЗ є досі невизначеним. Існують дані про кореляцію наявності ІПК в інтраопераційних перитонеальних змивах з погіршенням прогнозу виживаності. Протилежна думка у вчених Ferrone C. R. [93] та Broll R. [72]. Згідно з результатами, загальна виживаність таких хворих, незважаючи на радикальне хірургічне видалення пухлини, не відрізнялась від ЗВ хворих після симптоматичних операцій. Не вивченою залишається діагностична значимість методу виявлення ІПК в перитонеальних змивах, радикально оперованих хворих на РПЗ із застосуванням кріофіксації пухлини.

ІПК в групі порівняння (Р) досліджували в 14 (30,4 %) хворих з локалізацією пухлини в проксимальному відділі ПЗ та у 8 (17,4 %) – з локалізацією в дистальному відділі ПЗ, що представлено (табл. 4.6). Середній вік хворих складав (60 ± 2) роки (95 % ВІ: 55,8–64,2 роки). Розподіл хворих за статтю не відрізнявся, частота хворих чоловічої статі складала 11 (50,0 %), жіночої – теж 11 (50,0 %). У всіх хворих діагноз було морфологічно верифіковано – ПАПЗ діагностовано в 100,0 %. На передопераційному етапі визначали онкомаркери СА 19-9 та РЕА: медіана СА 19-9 склала $(185,7 \pm 82,3)$ Од/мл (95 % ВІ: 114,5–312 Од/мл); середнє значення рівня РЕА становило $(3,0 \pm 0,5)$ нг/мл (95 % ВІ: 1,9–4,3).

Таблиця 4.6

Дослідження ППК у хворих групи (Р) залежно від локалізації пухлини у проксимальному та дистальному відділах ПЗ

| Дослідження ППК | Локалізація пухлини, n (%) | | Всього, n (%) |
|-----------------|-----------------------------------|---|---------------|
| | проксимальний відділ ПЗ (голівка) | дистальний відділ ПЗ (тіло, хвіст, на межі тіла-хвоста) | |
| Досліджували | 14 (30,4) | 8 (17,4) | 22 (47,8) |
| Не досліджували | 21 (45,7) | 3 (6,5) | 24 (52,2) |
| Разом | 35 (76,1) | 11 (23,9) | 46 (100,0) |

Тип резекцій ПЗ у 22 хворих, у яких досліджувались ППК, представлено у вигляді діаграми (рис. 4.3).

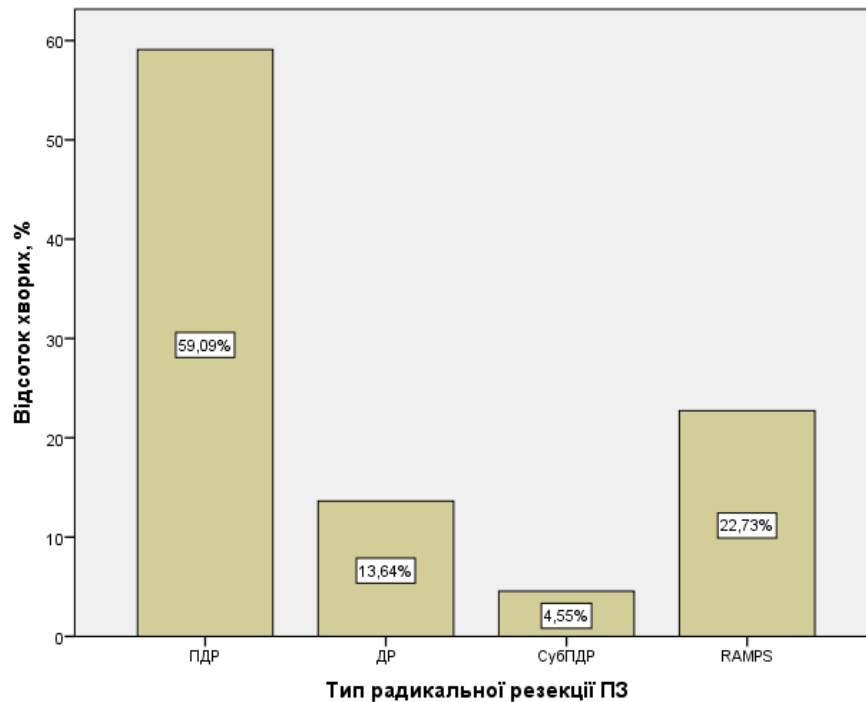


Рис. 4.3. Тип радикальної резекції ПЗ у групі хворих (n=22), де досліджувались ППК.

Фундаментальні клінічні дослідження ППК є ключем до розуміння біології метастазів, перитонеальної дисемінації та причин ранніх рецидивів у радикально оперованих хворих. В нашій країні, на жаль, можливість таких досліджень обмежена через відсутність високоякісного спеціального

діагностичного обладнання та стандартизованих технологій виявлення ІПК [30].

Метою нашого дослідження була спроба оцінити цитологічним та імуноцитологічним методами вплив ІПК в перитонеальних змивах на ЗВ, БВ у радикально оперованих хворих на РПЗ, а також вплив хірургічного втручання на перитонеальну дисемінацію РПЗ та встановлення діагностичної значимості методу виявлення ІПК, як додаткового «інструмента» контролю ефективності проведення кріофіксації солідної резектабельної пухлини ПЗ.

Змиви під час операції брали з 3 зон (правий та лівий піддіафрагмальний простори, малий таз) після того, як в черевну порожнину інсуфлювали 3 л фізіологічного розчину, температура якого складала близько 37 °С.

Методологія забору зразків змивів з очеревини: 1-й забір виконували на початку операції – безпосередньо після виконання лапаротомії, до ревізії ОЧП та будь-яких маніпуляцій з пухлиною; 2-й забір проводили наприкінці операції – перед встановленням дренажів та ушиванням лапаротомної рани.

Методика виявлення ІПК в змивах з очеревини радикально оперованих хворих на РПЗ також була заснована на принципі приготування цитоблоків, як і при виявленні ЦПК. Відмінність полягала лише в тому, що з ємності, що містила лаважну рідину, через 16 год відстоювання при 4 °С аспірували надосадову рідину, клітинний осад ресуспендували, розливали в пробірки та центрифугували при 3000 об. хв. Після цього надосадову рідину повторно видаляли. Клітинний осад ресуспендували, розливали у форми 24x24x5 мм та заливали розплавленим агаром. Подальша методика приготування цитоблоків не відрізнялась від описаної вище при дослідженні ЦПК. Для цитологічного дослідження ІПК виконували забарвлення гематоксиліном та еозином. Для ІЦХ дослідження використовували моноклональні антитіла (mCEA DAKO, клон-П-7, Данія) та до СА 19-9 (клон С241:5:1:4, Diagnostic Biosystems, USA).

У жодного з 22 хворих у зразках перитонеальних змивів, забораних відразу після лапаротомії, не було виявлено ІПК ні при застосуванні звичайного цитологічного методу, ні ІЦХ. У 2 хворих ІЦХ методом виявлено ІПК на заключному етапі операції, що склало 9 % від загальної кількості хворих (n=22), у яких визначались ІПК. При аналізі ЗВ та БВ не встановлено ніяких тенденцій щодо впливу цих знахідок на прогноз у радикально оперованих хворих. Медіана БВ для групи цих хворих складала 12 міс. [11, 84]. В пацієнтки Б., 1937 р.н., оперованої 28.02.13 р. з приводу аденокарциноми хвоста ПЗ (Т3N0M0) в об'ємі дистальної резекції залози зі спленектомією, в перитонеальному змиві на заключному етапі операції, до ушивання лапаротомної рани, було виявлено ІПК (рис. 4.4).

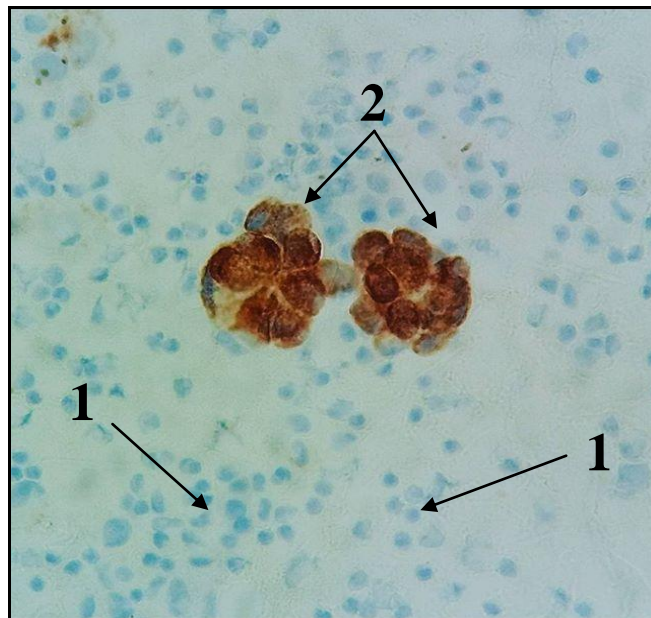


Рис. 4.4. ІЦХ (+) mCEA (хвора Б., 1934 р. н.). Виявлено кластери ІПК аденокарциноми ПЗ (2), оточені клітинами мезотелію (1) в перитонеальному змиві на заключному етапі операції.

В післяопераційному періоді хвора Б., 1937 р. н. хіміотерапію не отримувала у зв'язку з соціально обтяженим анамнезом. При контрольному візиті через 1 рік СА 19-9=14,83 Од/мл, на МРТ ОЧП – дані за рецидив, перитонеальну дисемінацію, метастазування були відсутні.

В одного хворого (T3N1M0) з позитивними знахідками в перитонеальних змивах було встановлено метакхронні метастази в печінку на 12 міс. спостереження без ознак перитонеального карциноматозу, він помер унаслідок прогресування основної хвороби на 21 міс спостереження.

В рекомендаціях NCCN зазначено, що прогноз у радикально оперованих хворих на РПЗ, в інтраопераційних перитонеальних змивах яких цитологічно виявляють пухлинні клітини, є еквівалентним до тих, які мають метастатичну форму хвороби, з посиланням тільки на одне дослідження групи Ferrone C.R. [93]. До цього дослідження Ferrone C.R. було залучено 462 хворих на РПЗ, з яких 217 хворих (47 %) – радикально оперовані, 245 хворим (53 %) – не було виконано радикальних втручань з причини метастатичної або локально-поширеної форми РПЗ, встановленої при первинній хірургічній ревізії. Змиви брали під час ревізії з 3 зон, як у нашому дослідженні. Цитологічне підтвердження пухлинних клітин в перитонеальних змивах було отримано у 17 % (77/462) хворих. Серед нерадикально оперованих хворих позитивні перитонеальні змиви не впливали на виживаність цих хворих. Серед радикально оперованих хворих частота позитивних перитонеальних змивів склала 5 % (10/217). Різниця 2-річної виживаності в останніх дорівнювала 23 % з 117 з негативною цитологією і 12 % з 10 – у хворих з позитивною цитологією, $p=0,006$. Такий показник у цьому дослідженні узгоджується з 2-річною виживаністю хворих з метастатичним РПЗ (загальною кількістю 150), яких не було радикально оперовано. Вочевидь, автори мали на увазі, що 2 роки прожив тільки 1 хворий з 10. А з цих 10 у 8 пацієнтів виявлено метастази в регіонарних лімфовузлах, що власно саме є незалежним фактором, який погіршує виживаність, водночас посилань на частоту уражень лімфовузлів у хворих з негативною цитологією для адекватного порівняння ми в статті не знаходимо. Таким чином, на наш погляд, висновок про те, що прогноз радикально оперованих хворих на РПЗ з цитологічно позитивними перитонеальними змивами можна прирівняти до таких з метастатичним РПЗ, не є достатньо обґрунтованим, як і в роботі Meszoely I. M. et al. [130], які

провели дослідження перитонеальних змивів у 135 радикально оперованих хворих на РПЗ, у 13 (9,6 %) з яких змиви виявились позитивними. При порівнянні медіани часу до настання рецидиву та медіани загальної виживаності хворих з позитивними й негативними змивами не було встановлено статистично значної різниці між ними.

Діагностика цпДНК методом полімеразної ланцюгової реакції у хворих на ПАПЗ з KRAS-мутацією. У 2013 р. на кафедрі загальної хірургії № 1 НМУ ім. О. О. Богомольця спільно з Інститутом Кюрі (Париж, Франція) в рамках договору (№ МТА 20130067 від 26.04.2013 р.) про міжнародне наукове співробітництво проводилося дослідження з вивчення динаміки зміни концентрації циркулюючої пухлинної дезоксирибонуклеїнової кислоти (цпДНК) в зразках плазми крові хворих з резектабельним РПЗ – до, під час та після хірургічного видалення первинної пухлини.

Відомо, що цпДНК вивільняється в кров разом з пухлинними клітинами. Мало відомо про динаміку зміни концентрації цпДНК, у т. ч. вплив інтраопераційної травми пухлини на рівень цпДНК під час радикального хірургічного її видалення у хворих РПЗ.

Нами виконано спробу вивчити динаміку зміни цпДНК у хворих на резектабельний РПЗ в якості додаткового «інструмента» ефективності проведення криофіксації солідної пухлини ПЗ. Ми припустили, що коефіцієнт очищення крові від цпДНК може бути використаний як інструмент для визначення ефективності хірургічного лікування хворих, і може надати можливість визначати наявність мінімальної залишкової (резидуальної) мікрометастатичної хвороби у пацієнтів, які перенесли радикальне хірургічне видалення первинної пухлини, і бути маркером ефективності криофіксації пухлини.

РПЗ є доречною моделлю для перевірки цієї гіпотези, оскільки більшість аденокарцином ПЗ мають KRAS-мутації (80–90 %), які можуть бути виявлені в плазмі, тим самим підвищуючи специфічність і чутливість методу ПЛР до 100 %.

У 2013 році в дослідження було включено 10 пацієнтів, що склало 21,7 % від загальної кількості хворих на резектабельний РПЗ в групі (Р). Всі пацієнти, включені в дослідження, підписували «Форму інформованої згоди», яка була затверджена Комісією з питань етики при НМУ ім. О. О. Богомольця (протокол засідання №72 від 29.05.2013).

Для кількісного визначення цпДНК використовували плазму крові хворих. У включених у дослідження пацієнтів, повторно проводили забір зразків крові до, під час і після радикальної резекції ПЗ. В день операції за 1 год до лапаротомії виконували 1-й забір крові з *v.subclavia dextra* (*v.jugularis int. dextra*). Під час операції 2-й забір крові виконували з *v.subclavia dextra* (*v.jugularis int. dextra*) відразу після повної мобілізації пухлини; в часі це збігалось з забором 3-го зразка крові з системи *v.portae*. В кінці операції, перед ушиванням лапаротомної рани, 4-й зразок крові забирали з *v.subclavia dextra* (*v.jugularis int. dextra*). В післяопераційному періоді з 2-го по 5-й день включно двічі на добу о 9.00 і 21.00 виконували забір крові з *v.subclavia dextra* (*v.jugularis int. dextra*); з 6-го по 10-й день – забір крові виконували 1 раз на добу о 9.00 також із *v.subclavia dextra* (*v.jugularis int. dextra*). Останній, 20-й зразок крові, забирали в період з 14-го дня до 1 міс. після операції з *v.subclavia dextra* (*v.jugularis int. dextra*).

Венозну кров забирали в кількості 4 мл в спеціальну вакуумну пробірку типу Vacutainer з EDTA. Пробірку обережно перевертали кілька разів для перемішування крові з антикоагулянтном. Після 30 хв відстоювання, пробірку центрифугували зі швидкістю 3000 об./хв протягом 20 хв при кімнатній температурі; потім пробірку встановлювали в штатив. Після відділення формених елементів від плазми, з верхньої частини надосадової рідини автоматичною піпеткою Biotech забирали 1.5 мл плазми окремим одноразовим наконечником з аерозольним бар'єром фірми «Ахуген» (сертифікат якості на відсутність ДНК, ДНК-аз) і поміщали в пробірку Eppendorf DNA LoBind (1,5 мл) також сертифіковану на відсутність ДНК, ДНК-аз, РНК-аз, ПЛР-інгібіторів. Пробірки зберігали при $t = -70$ °С. Плазму

крові пацієнтів зберігали в замороженому стані до моменту передачі в лабораторію Інституту Кюрі, у т. ч. на етапі транспортування. Транспортування матеріалу здійснювалося в спеціальному термоконтєйнері з охолоджуючими елементами.

Парафіновий блок, що містив формалін-фіксований фрагмент ПАПЗ, досліджували на предмет наявності KRAS-мутації в лабораторії Інституту Кюрі. У разі відсутності KRAS-мутації (20–30 %) зразки плазми у даної категорії хворих в подальшому не досліджувались на предмет кількісного виявлення цпДНК.

З 10 хворих, які були включені в дослідження, у 7 (70 %) в матеріалі парафінових блоків формалін-фіксованої пухлинної тканини була виявлена KRAS-мутація.

Середній вік хворих, у яких виявлена KRAS-мутація складав 59,4 (50–75 років). Локалізація пухлини в ПЗ: проксимальний відділ ПЗ (голівка) – 57,1 % (n=4), дистальний відділ ПЗ (тіло, хвіст, на межі тіла-хвоста ПЗ) – 42,9 % (n=3). Характер виконаного оперативного втручання: панкреатодуоденальна резекція по Whipple – 42,9 % (n=3), субтотальна проксимальна резекція ПЗ – 14,3 % (n=1), дистальна резекція ПЗ – 28,6 % (n=2), RAMPS – 14,3 % (n=1). Ступінь диференціювання пухлини: G1 – 14,3 % (n=1); G2 – 42,9 % (n=3); G3 – 28,6 % (n=2); G2-G3 – 14,3 % (n=1). Медіана тривалості операції склала 6,5 (0,8) год (95 % ВІ: 3.15–7.5). Обсяг інтраопераційної крововтрати (557,1 ± 163,1) мл (95 % ВІ: 158,1–956,2). Медіана доопераційного рівня онкомаркера СА 19-9 склала 198,2 Од /л. У 57,1 % випадків зустрічався с.35G > А тип KRAS-мутації, с.34G > С (14,3 %), с.35G > Т (14,3 %), с.183А > С (14,3 %).

У жодному зразку плазми крові, забраної як до, під час, так і після операції методом цифрової крапельної ПЛР, цпДНК не була виявлена. Аналіз причин відсутності виявлення цпДНК вказує на однозначне виключення можливості помилки на етапі забору, зберігання або транспортування зразків замороженої плазми. Методика цифрової крапельної ПЛР не відрізнялась від

такої для виявлення генних мутацій при інших патологіях, таких як рак молочної залози, меланома. Вочевидь, наразі нам ще не відомий фактор, який впливає на цпДНК саме у хворих з ПАПЗ.

У зв'язку зі складними критеріями відбору, незначним відсотком хворих, яким вдається виконати радикальну резекцію ПЗ з гістологічно верифікованою ПАПЗ, високою вартістю молекулярно-генетичної діагностики – на даному етапі, дослідження з виявлення динаміки зміни концентрації цпДНК в плазмі хворих на РПЗ було призупинено.

Незважаючи на потенційні перспективи, які має метод цифрової крапельної ПЛР для кількісного визначення динаміки зміни цпДНК у хворих з резектабельним РПЗ, рекомендувати його в даний момент часу для рутинного застосування не можна, оскільки метод потребує вдосконалення і поглибленого подальшого вивчення та стандартизації методик [14, 140].

Висновки

1. Частота виявлення ЦПК в крові з центральної вени до лапаротомії, портальної вени – після мобілізації пухлини, центральної вени – перед ушиванням лапаротомної рани у 24 радикально оперованих хворих з резектабельним РПЗ склала 0 %. ЦПК не було виявлено в жодному із 72 дослідних зразків крові як при застосуванні звичайного цитологічного методу, так і при використанні ІЦХ методу діагностики.

2. Частота виявлення ІПК в перитонеальних змивах з очередини відразу після лапаротомії до маніпуляцій з пухлиною ПЗ у 22 хворих на резектабельний РПЗ склала 0 %. В 9 % (2 з 22 хворих) кластери ІПК були виявлені в перитонеальних змивах імуноцитохімічним методом перед ушиванням лапаротомної рани. Наш досвід показав, що імуноцитохімічний метод дослідження перитонеальних змивів, незважаючи на вищу його чутливість і специфічність порівняно з рутинним цитологічним дослідженням, на сучасному етапі не може бути використаний для оцінки інтраопераційної перитонеальної дисемінації РПЗ та прогнозу виживаності радикально-оперованих хворих на РПЗ. Наявність ІПК аденокарциноми ПЗ

в перитонеальних змивах не є протипоказом до радикальної операції в потенційно резектабельних випадках. Довгострокову виживаність можна очікувати у хворих на резектабельний РПЗ, навіть за наявності ІПК в перитонеальних змивах, у разі адекватного мультимодального підходу в лікуванні.

3. Цитологічний та імуноцитохімічний методи виявлення ЦПК в крові та ІПК в перитонеальних змивах не може бути рекомендований на сьогодні, як додатковий «інструмент» контролю ефективності проведення кріофіксації солідної злоякісної пухлини ПЗ, через вкрай низьку інформативність.

4. Метод цифрової крапельної ПЛР для кількісного визначення цпДНК у хворих з резектабельним РПЗ з KRAS-мутацією на сьогодні не можна використовувати як рутинний метод контролю ефективності лікування, в т. ч. для визначення ефективності кріофіксації солідних злоякісних резектабельних пухлин ПЗ.

Основні положення розділу 43 показано в працях автора [11], [14], [84], [140].

РОЗДІЛ 5

КРІОФІКСАЦІЯ РЕЗЕКТАБЕЛЬНИХ СОЛІДНИХ ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ В ГРУПІ ПОРІВНЯННЯ (К+Р)

У 2015 р. було проведено 2-й етап клінічного дослідження. Метод попередньої кріофіксації резектабельної солідної злоякісної пухлини при хірургічному лікуванні НЗПЗ був застосований у 21 хворого, які увійшли в групу порівняння (К+Р). Малий об'єм вибірки групи (К+Р) був зумовлений, по-перше, характером патології та вкрай низьким відсотком хворих, у яких на момент встановлення діагнозу були наявні критерії резектабельності пухлини без інвазії в магістральні судини за даними передопераційних методів променевої (МСКТ, МРТ, МРПХГ) та інструментальної діагностики; по-друге, набір пацієнтів у групу був свідомо призупинений з етичних міркувань на початку 2016 р. після проведення гістоморфометричного аналізу мікропрепаратів зрізів пухлинної тканини, виготовлених з видалених солідних злоякісних пухлин ПЗ, про що більш детально йдеться далі.

Метою 2-го етапу дослідження було:

- визначити температурний градієнт кріофіксації пухлини у фіксованих точках на різній глибині від поверхні кріоаплікатора;
- визначити морфологічні зміни фіксованих точок у пухлині, що піддавалась кріофіксації, та встановити кореляційний зв'язок між цими змінами та температурним градієнтом.

Пацієнтам групи порівняння (К+Р) спочатку проводили кріофіксацію пухлини з наступним виконанням резекції ПЗ за стандартною методикою. Хворі групи (К+Р) склали 19,8 % від загальної кількості (n=97), включених у дослідження в період 2010–2017 рр.

Середній вік хворих групи (К+Р) складав ($61,6 \pm 2,1$) роки (95 % ВІ: 57,1–66,1 років). Жінок було 8, чоловіків – 13, що склало 38,1 та 61,9 % відповідно.

Частота локалізації пухлин у проксимальному відділі ПЗ переважала її частоту в дистальних відділах залози. Так, у головці ПЗ солідна резектабельна пухлина локалізувалась у 14 (66,7 %) хворих, у хвості – 1 (4,8 %), у тілі – в 4 (19 %), на межі тіла-хвоста ПЗ в 2 (9,5 %). Розподіл хворих за статтю залежно від типу виконаної резекції ПЗ в групі (К+Р) представлено на рисунку 5.1.

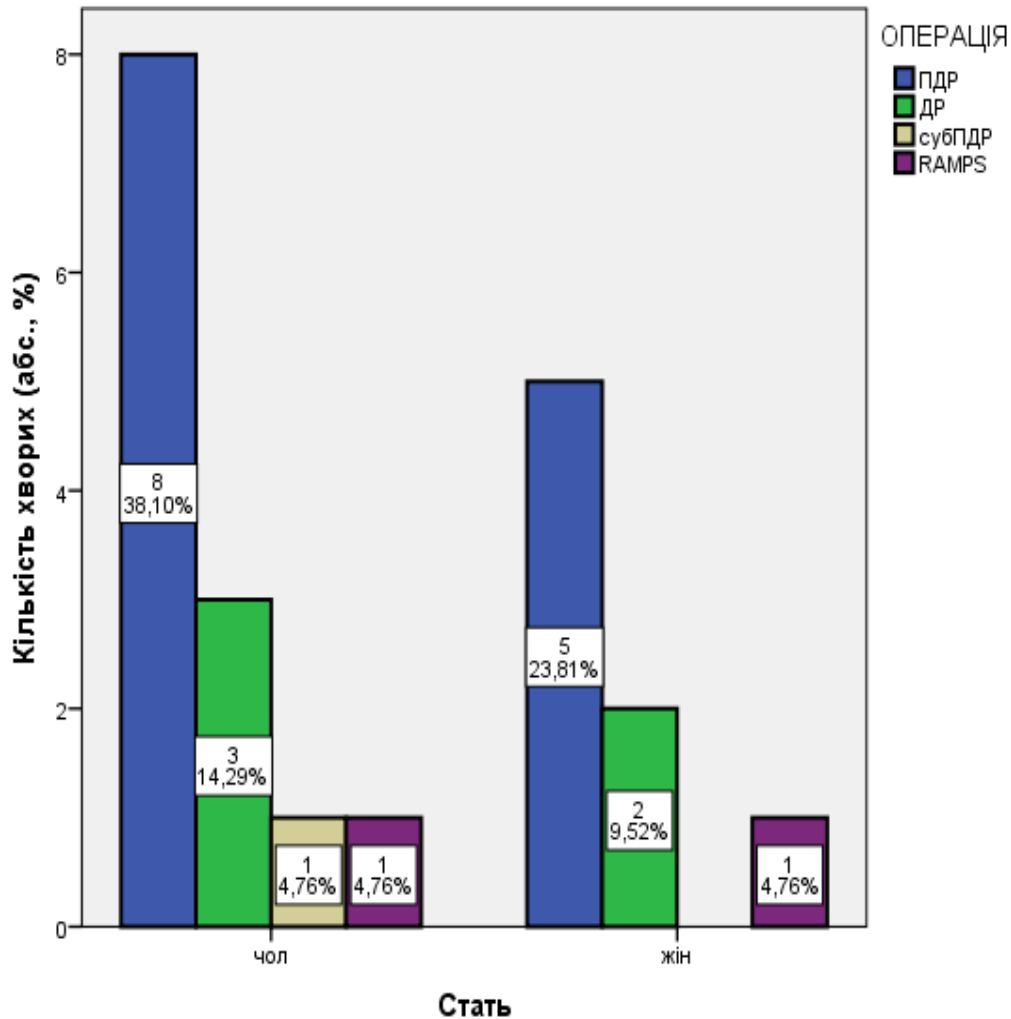


Рис. 5.1. Розподіл хворих за статтю залежно від типу резекції ПЗ/

ПДР за Whipple виконано у 13 хворих (62 %), дистальну резекцію ПЗ – 5 (23,8 %), субтотальну ПДР – в 1 хворого (4,7 %), RAMPS – 2 (9,5 %).

Характер проведених оперативних втручань в групі був обумовлений локалізацією пухлини ПЗ в проксимальному чи дистальному її відділах.

При локалізації пухлини в головці ПЗ виконували верхньосерединну-середньосерединну лапаротомію, проводили ревізію органів черевної порожнини, виключали бластоматозний асцит, канцероматоз очеревини, метастатичне ураження печінки, парааортальних лімфатичних вузлів. Шляхом широкої мобілізації шлунково-ободової зв'язки виключали мультифокальне ураження ПЗ. Особливу увагу звертали на вени великого та малого сальника. При їх вираженій дилатації, повнокровності, звивистості кріофіксацію не проводили, оскільки вважали ці ознаки непрямими предикторами венозної інвазії пухлини головки ПЗ в ділянці портomezентеріального конfluence, що не були діагностовані за даними передопераційних інструментальних методів діагностики. Враховуючи дані передопераційних інструментальних методів обстеження (УЗД ОЧП, МСКТ ОЧП, МРПХГ) про відсутність інвазії пухлини в магістральні судини та дані інтраопераційної ревізії органів черевної порожнини – остаточно встановлювали критерії резектабельності пухлини згідно з класифікацією NCCN 2016 р. Мобілізацію ДПК за Кохером та будь-які маніпуляції з головкою ПЗ під час ревізії не проводили до виконання кріофіксації пухлини. Усі ці дії були спрямовані на профілактику інтраопераційної дисемінації пухлинних клітин.

При локалізації пухлини в тілі ПЗ, після широкої мобілізації шлунково-ободової зв'язки виключали інвазію пухлини у верхню брижову артерію та вену, черевний стовбур, задню стінку шлунка, брижу ободової кишки. Після остаточного встановлення критеріїв резектабельності пухлини, виключення місцевого розповсюдження пухлини – проводили підготовку операційного поля для виконання кріофіксації пухлини. До кріофіксації пухлини ПЗ з локалізацією в тілі та на межі тіла-хвоста ПЗ додатково мобілізували ділянку дуоденоєюнального згину. Марлевими серветками відмежовували задню стінку шлунка та ділянку дуоденоєюнального переходу з метою уникнення холододового ятрогенного пошкодження даних порожнистих органів.

При локалізації пухлини в хвості ПЗ методологія підготовки операційного поля відрізнялась від попередньої лише тим, що після розкриття

сальникової сумки шляхом мобілізації середньої третини та лівої третини шлунково-ободової зв'язки додатково виконували мобілізацію шлунково-селезінкової зв'язки з поетапним пересіченням та лігуванням коротких шлункових судин. Даний оперативний прийом був зумовлений необхідністю забезпечення повноцінного контакту всієї робочої поверхні кріоаплікатора з поверхнею пухлини в даній ділянці залози.

У всіх випадках оперативні втручання проводили із застосуванням титанового ранорозширювача – підйомника реберних дуг типу Sigal, що значно полегшувало етап проведення кріофіксації пухлини.

Під контролем інтраопераційної ультрасонографії на передній поверхні ПЗ безпосередньо над пухлиною позиціонували тримач термопар КВІТ-4, детальну технічну характеристику вимірювального комплексу представлено в розділі 2.

В солідну пухлину головки, тіла, хвоста ПЗ через умовний її центр вводили мідь-константанові термопари діаметром 1 мм в кількості 4-х на фіксовану глибину 3, 8, 13 та 18 мм відносно передньої поверхні пухлини. Таким чином, найвіддаленіша четверта термопара (Т4) довжиною 18 мм розміщувалась найближче до підлеглих магістральних судин залежно від топографії пухлини в ПЗ.

Кріофіксацію проводили універсальною кріохірургічною установкою «Кріо-Пульс», виробництва НВФ «Пульс» (м. Київ, Україна). Кріофіксацію пухлини, незалежно від локалізації її в проксимальному чи дистальному відділі ПЗ, виконували кріоаплікатором діаметром 30 мм, а температура робочої його поверхні складала $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Кріофіксацію виконували подвійним циклом. Тривалість періоду заморозки кожного циклу складала 10 хв, період відтавання завжди був спонтанний.

Результати динаміки змін температури на дискретних глибинах у солідній резектабельній пухлині підшлункової залози під час процесу кріофіксації. Оцінювали середню температуру в пухлині ПЗ на дискретних

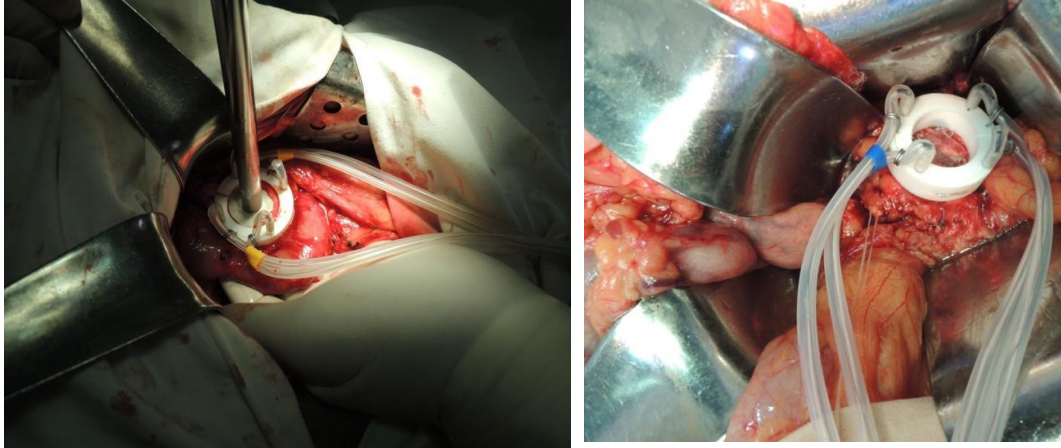
глибинах (3, 8, 13 та 18 мм), яка була досягнута наприкінці 10-ї хв другого циклу кріофіксації. Після видалення пухлини проводили зрізи на тих глибинах, на яких було зареєстровано температуру (3, 8, 13 і 18 мм), готували гістологічні мікропрепарати за стандартною методикою. За допомогою мікроскопа OLYMPUS CX 41 з вбудованою камерою розраховували відсоток ПК (табл. 6.2) з необоротними, оборотними деструктивними змінами та життєздатними пухлинними клітинами в зрізі в автоматичному режимі за допомогою програмного забезпечення Quick PHOTO MICRO 2.3. У ручному режимі проводили якісну оцінку ушкодження гемомікроциркуляторного русла в пухлинній тканині.

Критерії ефективності проведення кріофіксації пухлини ПЗ були засновані на морфологічних змінах у пухлинній тканині: наявність тромбозів у судинах гемомікроциркуляторного русла пухлинної тканини у всіх полях зору мікропрепарату; відсутність у полі зору в гістологічному препараті ПК, які не мають маркерів необоротного первинного кріопошкодження. До маркерів необоротного первинного кріопошкодження ПК відносили розрив цитоплазматичної мембрани, розриви ядра клітини, поєднання розриву ядра та цитоплазматичної мембрани. При програмній обробці Quick PHOTO MICRO 2.3 гістологічних мікропрепаратів пухлинної тканини – клітини, що мали ознаки необоротного первинного кріопошкодження, позначали фазою червоного кольору, життєздатні ПК та ПК з оборотними деструктивними змінами – фазою синього кольору, тромби в судинах – фазою помаранчевого кольору.

Кріофіксація пухлини ПЗ (рис. 5.2) з локалізацією в головці виконана у 14 хворих, з локалізацією в тілі ПЗ – у 6, у хвості ПЗ – в одного пацієнта.

Середній об'єм пухлини з локалізацією в головці ПЗ (n=14) складав $(17,9 \pm 3,1)$ см³, що достовірно менше, ніж об'єм пухлини з локалізацією в дистальних відділах ПЗ (n=7) – $(31,6 \pm 5,2)$ см³, на рівні значущості $p < 0,001$. Це обумовлено часом клінічної маніфестації захворювання і більш раннім зверненням пацієнта в клініку при локалізації пухлини в головці залози через появу синдрому механічної жовтяниці.

Після завершення періоду спонтанного відтавання сформованого сегмента льодяної кулі після другого циклу криофіксації при локалізації пухлини ПЗ в головці – ПДР за Whipple виконали у 13 (62 %) хворих, субтотальну ПДР – у 1 (4,7 %); при локалізації пухлини в дистальному відділі ПЗ – дистальну резекцію виконали у 5 (23,8 %) хворих, RAMPS – у 2 (9,5 %).



А

Б

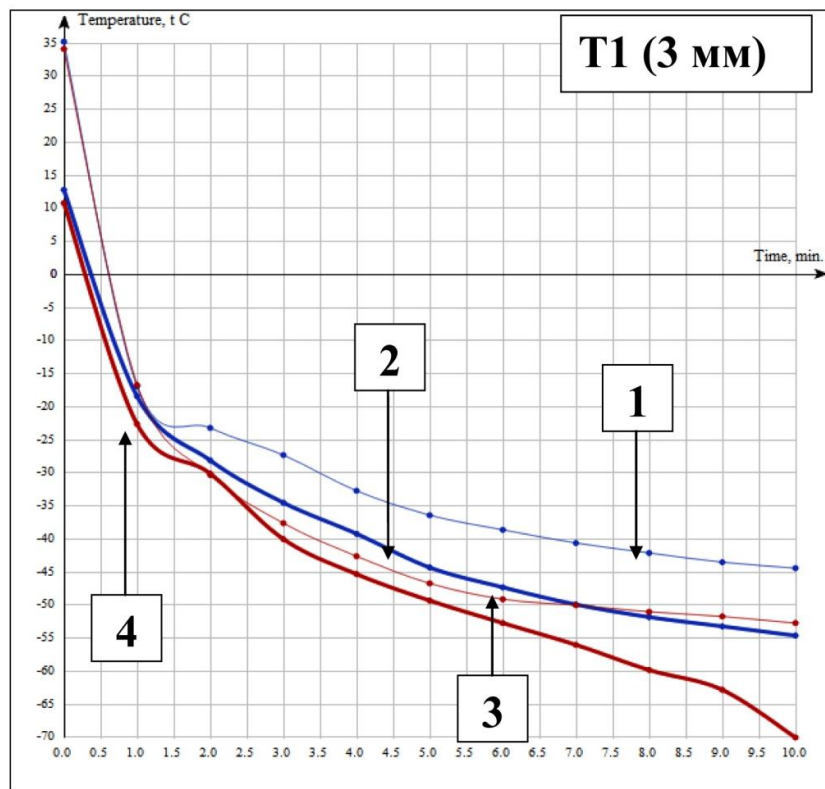
Рис. 5.2. Етап циклу криофіксації резектабельної пухлини:

А – заморозка головки ПЗ з інтраопераційною термометрією КВІТ-4;

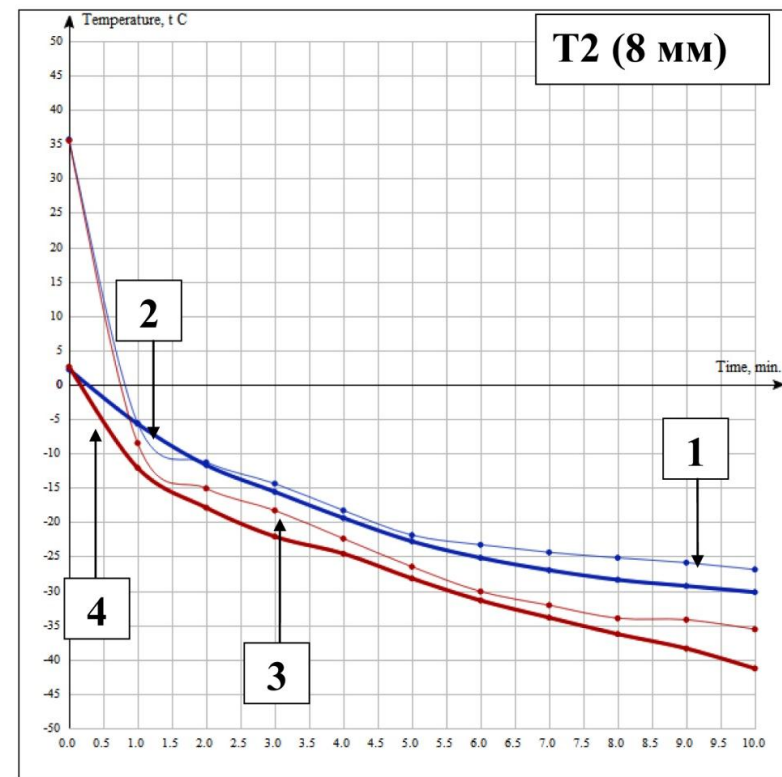
Б – спонтанне відтавання дистального відділу ПЗ з встановленими термопарами КВІТ-4 [22].

Динаміка зниження температури за показниками термопар Т1, Т2, Т3 та Т4 на дискретних глибинах (3, 8, 13 та 18 мм) від робочої поверхні криоаплікатора в пухлині ПЗ під час криофіксації подвійним циклом заморозки представлена на рисунках 5.3, 5.4 у вигляді термограм.

При локалізації солідної резектабельної пухлини в головці ПЗ як після першого, так і після другого циклу криофіксації температура не досягала мінусових значень (див. рис. 6.6) за показниками термопар Т4 (18 мм). При локалізації пухлини в дистальних відділах залози температура починала знижуватись нижче 0 °С в проміжку часу між 6-ю та 7-ю хв другого циклу криофіксації. Така особливість термограм обумовлена впливом масивного теплоприведення від магістральних судин у проекції головки ПЗ.



А

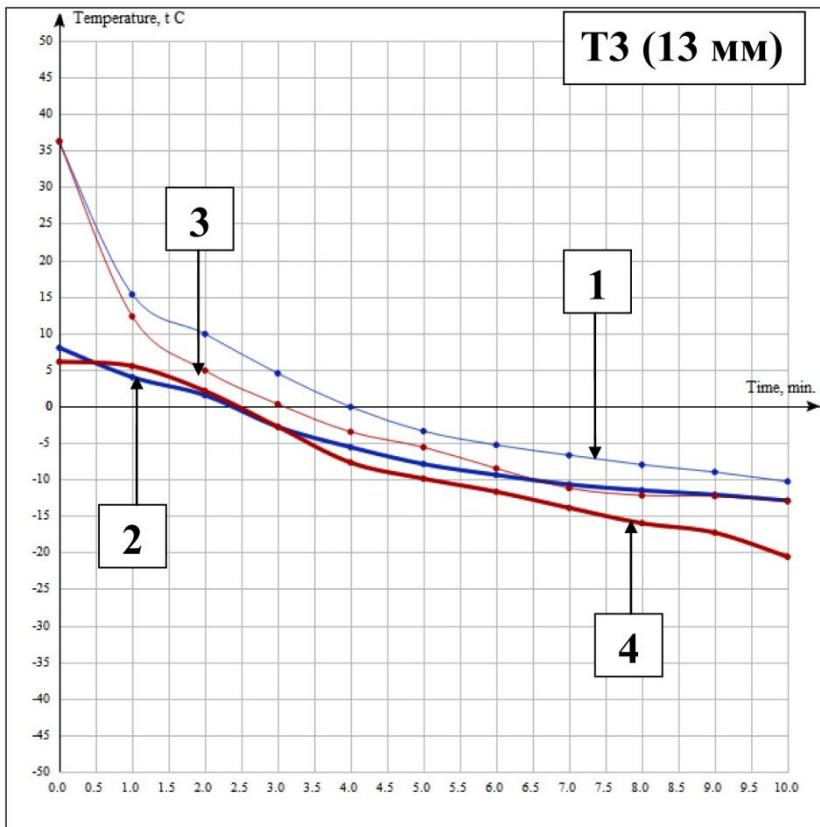


Б

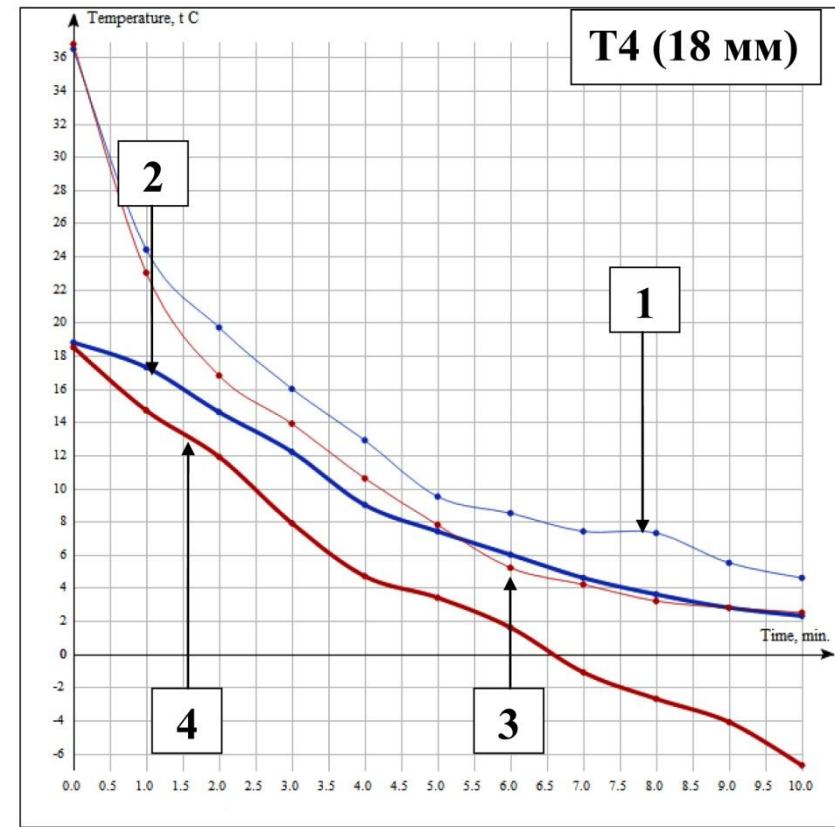
Рис. 5.3. Динаміка зниження температури в пухлині ПЗ під час криофіксації подвійним циклом заморозки: 1 – крива динаміки зниження температур (перший цикл заморозки) в підгрупі (К+Р)_I; 2 – крива динаміки зниження температур (другий цикл заморозки) в підгрупі (К+Р)_I; 3 – крива динаміки зниження температур (перший цикл заморозки) в підгрупі (К+Р)_{II}; 4 – крива динаміки зниження температур (другий цикл заморозки) в підгрупі (К+Р)_{II};

А – за показником термопарі Т1 на глибині 3 мм від поверхні криоаплікатора;

Б – за показником термопарі Т2 на глибині 8 мм від поверхні криоаплікатора.



А



Б

Рис. 5.4. Динаміка зниження температури в пухлині ПЗ під час криофіксації подвійним циклом заморозки: 1 – крива динаміки зниження температур (перший цикл заморозки) в підгрупі (К+Р)_I; 2 – крива динаміки зниження температур (другий цикл заморозки) в підгрупі (К+Р)_I; 3 – крива динаміки зниження температур (перший цикл заморозки) в підгрупі (К+Р)_{II}; 4 – крива динаміки зниження температур (другий цикл заморозки) в підгрупі (К+Р)_{II}:

А – за показником терморпари Т3 на глибині 13 мм від поверхні криоаплікатора;

Б – за показником терморпари Т4 на глибині 18 мм від поверхні криоаплікатора.

Дані про досягнуті значення середніх температур в кінці 10-ї хв другого циклу кріофіксації на дискретних глибинах у пухлині ПЗ залежно від локалізації в проксимальному чи дистальному її відділах представлені в таблиці 5.1. У хворих з локалізацією резектабельної солідної пухлини в тілі і хвості ПЗ при кріофіксації досягаються середні температури в діапазоні мінусових значень достовірно нижчі на глибині 3, 8, 13 та 18 мм порівняно з хворими, у яких пухлина локалізувалась у головці ПЗ на рівні значущості $p < 0,001$ [81].

Таблиця 5.1

Характеристика показників середніх температур в кінці 10-ї хв періоду заморозки 2-го циклу кріофіксації залежно від локалізації пухлини ПЗ в проксимальному та дистальному її відділах на дискретних глибинах (3, 8, 13 і 18 мм)

| Глибина вимірювання температури в пухлині ПЗ | Температура в пухлині ПЗ (n=21), $M \pm \sigma$ | | <i>p</i> |
|--|---|-------------------|----------|
| | головка (n=14) | тіло, хвіст (n=7) | |
| T1 (3 мм) | -54,7 (± 3,0) | -70,1 (± 1,3) | <0,001 |
| T2 (8 мм) | -30,2 (± 2,2) | -41,4 (± 1,5) | <0,001 |
| T3 (13 мм) | -12,9 (± 1,7) | -20,5 (± 1,0) | <0,001 |
| T4 (18 мм) | 2,3 (± 2,1) | -6,7 (± 1,7) | <0,001 |

При мікроскопії гістологічних препаратів пухлинної тканини ПЗ після двох циклів кріофіксації на глибині зрізу 3 мм від поверхні пухлини спостерігали наступні зміни: тотальний некроз та некробіоз ПК (рис. 5.5 А), виражений набряк строми пухлини. Програмна обробка препарату у вигляді червоної фази (рис. 5.5 Б) виявила необоротні деструктивні зміни у $(99,6 \pm 0,7) \%$ ПК. Середня температура за показниками термопари T1 на цій глибині (3 мм) склала $(-60,4 \pm 10,0) ^\circ\text{C}$, що дозволяє вважати її критичною для ПК ПЗ і абсолютно достатньою для ефективного проведення кріофіксації.

Починаючи з глибини 8 мм і до 18 мм включно, при програмній обробці мікропрепаратів відмічено появу синьої фази, яка відповідає ПК без маркерів необоротних деструктивних змін. Невідомо, як поведуть себе ці клітини у випадку їх інтраопераційної дисемінації при виконанні класичного варіанта резекції ПЗ, але вони асоціюються з потенційним ризиком появи мікрометастазів у післяопераційному періоді. На глибині 8 мм від поверхні пухлини частка ПК без маркерів необоротного пошкодження складає в середньому 21,5%. При детальному вивченні даних клітин було встановлено, що всі вони мали дистрофічні зміни без наявності маркерів необоротного пошкодження (каріорексис, розрив цитоплазматичної мембрани або їх комбінація). Дані клітини потенційно можуть ще загинути (рис. 5.6 А, 5.7 А).

Більше 70% ПК мали ознаки необоротних деструктивних змін унаслідок первинного кріопошкодження на глибині 3 і 8 мм від робочої поверхні кріоаплікатора, де досягались високі швидкості заморожування, а середня температура в кінці 10-ї хв періоду заморозки 2-го циклу кріофіксації складала $(-60,38 \pm 10)$ і $(-36,3 \pm 5,8)$ °C відповідно.

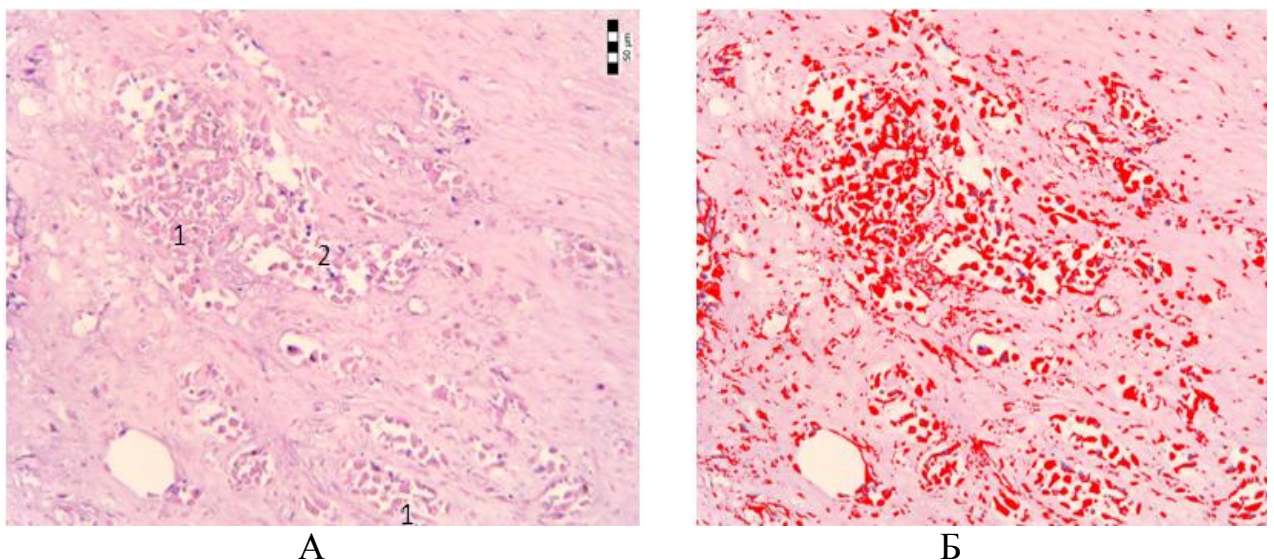


Рис. 5.5. Мікропрепарат пухлинної тканини ПЗ після кріофіксації. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. $\times 200$ (глибина зрізу від поверхні пухлини 3 мм): 1 – тотальний некроз ПК; 2 – некробіоз ПК (А), програмна обробка препарату у вигляді червоної фази (Б).

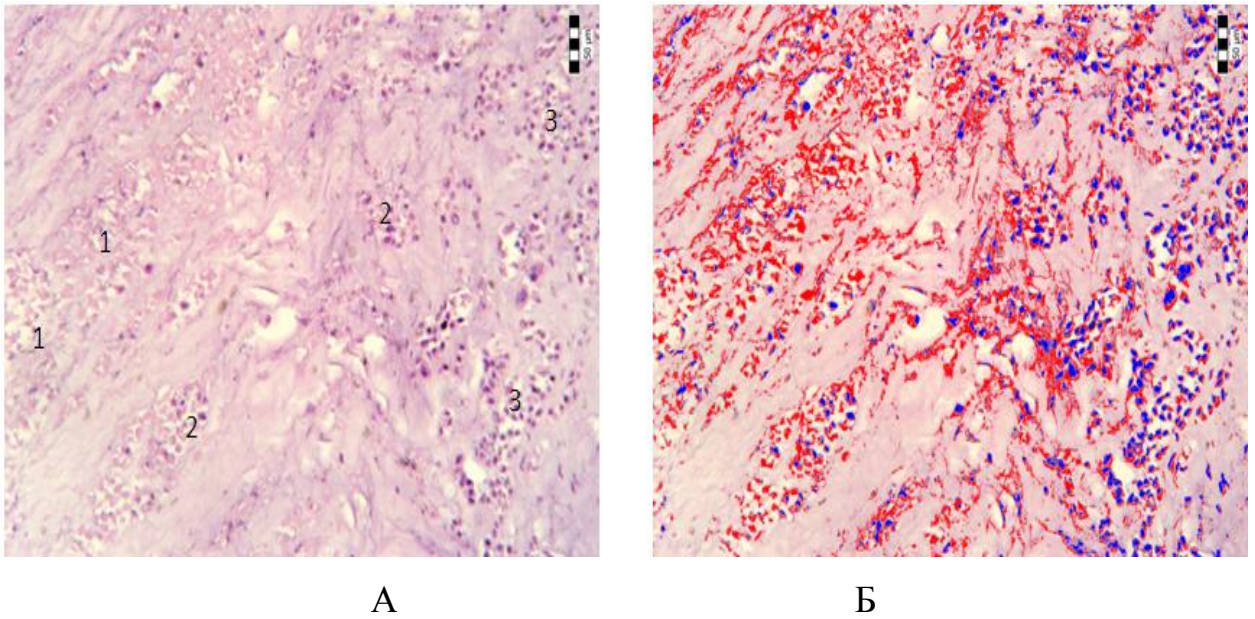


Рис. 5.6. Мікропрепарат пухлинної тканини ПЗ на глибині 13 мм від її поверхні. Забарвлення гематоксилином та еозином. Зб. $\times 200$: 1 – некроз; 2 – некробіоз; 3 – життєздатні ПК з дистрофічними змінами (А); програмна обробка препарату: червона фаза – ПК з необоротними змінами (некроз, некробіоз), синя фаза – ПК життєздатні, але з наявними дистрофічними змінами (Б).

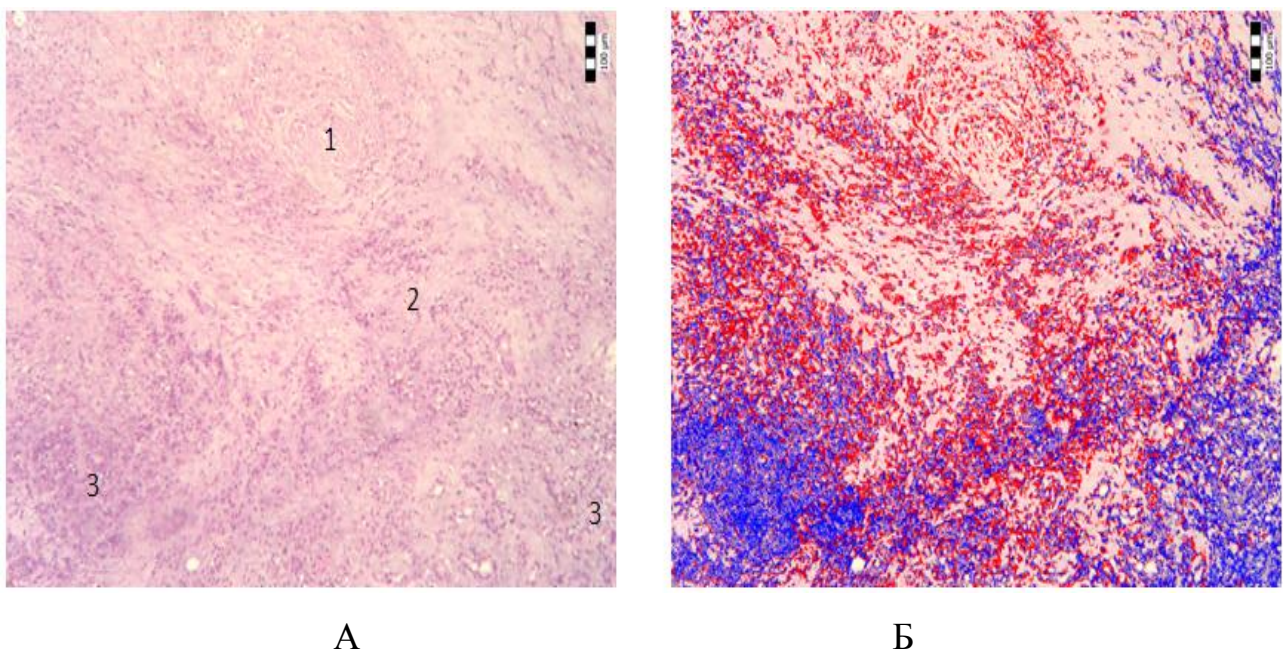


Рис. 5.7. Мікропрепарат пухлинної тканини ПЗ на глибині 18 мм від її поверхні. Забарвлення гематоксилином та еозином. Зб. $\times 100$: 1 – некроз; 2 – некробіоз; 3 – життєздатні ПК з дистрофічними змінами (А); програмна обробка препарату: червона фаза – ПК з необоротними змінами (некроз, некробіоз), синя фаза – ПК життєздатні, але з наявними дистрофічними змінами (Б).

На глибині 13 і 18 мм від робочої поверхні кріоаплікатора відсоток ПК з необоротними деструктивними змінами значно знижувався і корелював з досягнутою температурою на даних глибинах [17]. Встановлено лінійний кореляційний зв'язок ($R = -0,980$; $p = 0,020$) між рівнем досягнутої середньої температури в пухлинній тканині ПЗ і відсотком ПК, що загинули внаслідок первинного кріопошкодження (табл. 5.2) [81].

Таблиця 5.2

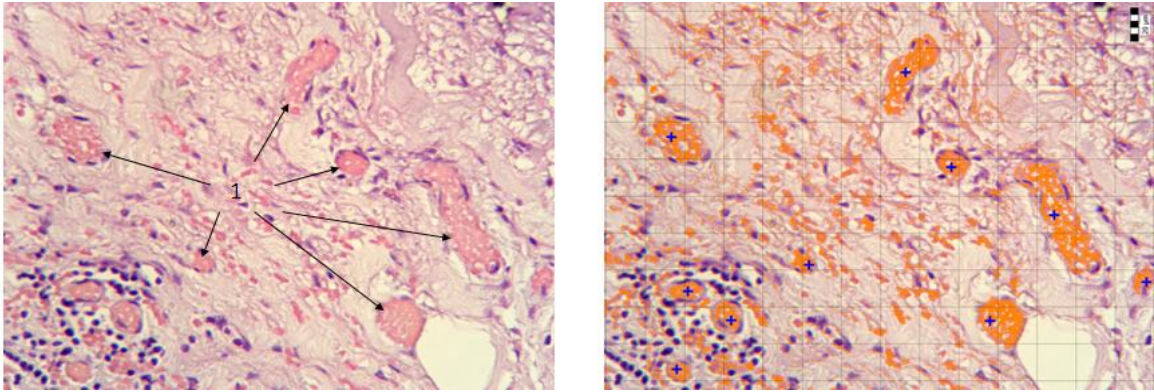
Характеристика показників середніх температур у пухлині ПЗ в кінці 10-ї хв періоду заморозки 2-го циклу кріофіксації на дискретних глибинах 3, 8, 13, 18 мм від робочої поверхні кріоаплікатора і відсоток ПК з необоротними деструктивними змінами на відповідній глибині

| Глибина вимірювання температури в пухлині (мм) | Середня температура (t °C) в пухлині ПЗ, $M \pm \sigma$ | Відсоток ПК з необоротними деструктивними змінами (%), $M \pm \sigma$ |
|--|--|---|
| T1 (3 мм) | -60,4 (± 10) | 99,6 ($\pm 0,7$) |
| T2 (8 мм) | -36,3 ($\pm 5,8$) | 78,5 ($\pm 7,6$) |
| T3 (13 мм) | -16,5 ($\pm 4,7$) | 28,5 ($\pm 7,4$) |
| T4 (18 мм) | -1,4 (± 5) | 2,7 ($\pm 2,9$) |

Тромбоз судин мікроциркуляторного русла пухлинної тканини (рис. 5.8) відмічався у всіх препаратах на всіх дослідних глибинах. На глибині 18 мм від поверхні пухлини при локалізації її в головці ПЗ спостерігали також внутрішньосудинний «сладж».

Його поява пов'язана з неможливістю досягнути в цій зоні критичних температур при кріофіксації в діапазоні мінусових значень, що обумовлено топографією головки ПЗ. Теплоприведення від великих магістральних судин у проекції головки ПЗ (нижня порожниста, воротна вена, аорта, права

ниркова артерія і вена) компенсують холодний фронт, що розповсюджується від робочої поверхні кріоаплікатора. Як наслідок, настає стан так званої «квазірівноваги», при якому, незважаючи на збільшення тривалості періоду заморозки циклу кріофіксації, сегмент льодяної кулі не збільшується [16].



А

Б

Рис. 5.8. Мікропрепарат пухлинної тканини ПЗ після двох циклів кріофіксації: 1 – судини мікроциркуляторного русла з тромбами в просвіті (А); програмна обробка препарату: помаранчева фаза – мікротромби в просвіті судин перитуморальної зони (Б). Забарвлення гематоксилином та еозином. Зб. $\times 200$

Висновки

1. У хворих з локалізацією резектабельної солідної пухлини в тілі і хвості ПЗ при кріофіксації досягаються статистично значущо більш низькі середні температури на глибині 3, 8, 13 і 18 мм порівняно з хворими, у яких пухлина локалізується в головці ПЗ, що обумовлено масивним теплоприведенням від магістральних судин у проекції головки залози.

2. Відсоток пухлинних клітин з необоротними деструктивними змінами зменшується із збільшенням відстані від робочої поверхні кріоаплікатора і корелює з досягнутою критичною температурою на конкретній глибині.

3. Тромбоз судин мікроциркуляторного русла в пухлинній тканині має місце в тих її ділянках, де було досягнуто температури нижче 0°C .

В пограничних із сегментом льодяної кулі ділянках пухлинної тканини, де температура вище 0 °С, переважає внутрішньосудинний складж.

4. Кріофіксація резектабельної солідної пухлини ПЗ подвійним циклом кріоаплікатором діаметром 30 мм з тривалістю експозиції періоду заморозки 10 хв зі спонтанним відтаванням не гарантує 100 % необоротної деструкції ПК за рахунок первинного кріопошкодження на глибині 3, 8, 13 та 18 мм від робочої поверхні кріоаплікатора.

Основні положення розділу 5 показано в працях автора [15], [16], [17], [22], [81].

РОЗДІЛ 6**ПОТЕНЦІЮВАННЯ МЕТОДУ КРІОФІКСАЦІЇ ДИСТИЛЬОВАНОЮ
H₂O ПРИ ХІРУРГІЧНОМУ ЛІКУВАННІ ХВОРИХ З
РЕЗЕКТАБЕЛЬНОЮ СОЛІДНОЮ ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИНОЮ
ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ В ОСНОВНІЙ ГРУПІ (Д+К+Р)**

Результати кріофіксації резектабельних солідних пухлин ПЗ в групі порівняння (К+Р) (див. розділ 6) спонукали до необхідності проведення низки досліджень з розробки методу потенціювання локальної кріодії на експериментальних моделях *in vitro* та *in vivo* (див. розділ 3).

Вперше виявлені в експерименті потенціюючі властивості дистильованої H₂O при локальному кріовпливі на біологічну тканину покладено в основу розробки способу посилення процесу кріофіксації резектабельної злоякісної солідної пухлини ПЗ.

У 2016–2017 рр. було проведено 3-й етап клінічного дослідження. Хворим на НЗПЗ основної групи (Д+К+Р) в солідну резектабельну пухлину за 5 хв до початку проведення кріофіксації вводили дистильовану H₂O з метою кріопотенціювання з наступним виконанням класичного варіанта резекції ПЗ залежно від локалізації пухлини в проксимальному чи дистальному її відділах. Метод потенціювання дистильованою H₂O процесу кріофіксації резектабельної солідної злоякісної пухлини при хірургічному лікуванні НЗПЗ був застосований у 30 хворих, які увійшли в основну групу (Д+К+Р). При розробці методу потенціювання кріофіксації НЗПЗ нами було прийнято рішення вдосконалити відомий спосіб посилення локальної кріодії на пухлину ПЗ шляхом повторенням циклів «заморожування-відтавання» [26], за яким посилення ефекту локальної кріодії на пухлину ПЗ забезпечується повторним виконанням періоду заморожування другого циклу кріодії після завершення періоду спонтанного відтавання першого циклу.

Позитивним у відомому способі посилення локальної кріодії є простота та зручність практичного рутинного застосування, адже метод, окрім кріохірургічної установки, не потребує додаткових спеціальних приладів чи обладнання. Втім, даний спосіб кріопотенціювання подовжує загальну тривалість оперативного втручання, тому що кожен наступний цикл локальної кріодії проводиться після повного спонтанного відтавання сформованої льодяної кулі; повторення циклів «заморожування-відтавання» двічі під час операції, все ж не гарантує повної деструкції клітин солідної злоякісної пухлини ПЗ, особливо, в найбільш віддалених від робочої поверхні кріоаплікатора її ділянках (див. розділ 6).

Тому ми мали на меті розробити спосіб посилення процесу кріофіксації злоякісної солідної пухлини у хворих на резектабельний РПЗ. Кріопотенціювання проводили за допомогою дистильованої H_2O , шляхом попереднього інтраопераційного її введення в пухлину ПЗ за 5 хв до початку локальної кріодії, з наступним виконанням класичного варіанта резекції залози залежно від локалізації пухлини. Підґрунтям для застосування саме дистильованої H_2O в якості засобу кріопотенціювання, у хворих на резектабельний РПЗ, стали результати фундаментальних експериментальних досліджень на моделях *in vitro* та *in vivo* (див. розділ 3).

При локалізації резектабельної солідної злоякісної пухлини в проксимальному відділі ПЗ (головка): хворому виконували верхньо-серединну лапаротомію; проводили ревізію органів черевної порожнини, виключали канцероматоз очеревини, віддалені метастази, локальну поширеність пухлини; розкривали сальникову сумку шляхом пересічення шлунково-ободової зв'язки для виключення мультифокального ураження ПЗ. За даними передопераційних методів обстеження (УЗД, КТ, МРТ) та інтраопераційної ревізії – остаточно визначали критерії резектабельності пухлини головки ПЗ без її мобілізації та пальпаторно-тракційних маніпуляцій.

Під контролем інтраопераційної ультрасонографії ділянки головки ПЗ визначали лінійні розміри пухлини: висоту, ширину та довжину.

За формулою 6.1 визначали об'єм пухлини

$$V_{п.} = (a \times b \times c) \times K, \quad (6.1)$$

де $V_{п.}$ – об'єм пухлини в см^3 ;

a – ширина пухлини;

b – довжина пухлини;

c – висота пухлини;

K – коефіцієнт Хігедіуса (стала, що становить 0,52).

За формулою 6.2 визначали об'єм дистильованої H_2O , що необхідно ввести в пухлину

$$V_{д.в.} = V_{п.} \times 0,38, \quad (6.2)$$

де $V_{д.в.}$ – об'єм дистильованої H_2O (мл^3);

$V_{п.}$ – об'єм пухлини (см^3);

0,38 – коефіцієнт (K), що визначений експериментально.

В якості дистильованої H_2O застосовували стерильну «Воду для ін'єкцій». За рахунок фізико-хімічних властивостей, якими володіє дистильована H_2O , а саме: здатність спричиняти осмотичний набряк пухлинних клітин за градієнтом концентрації, при якому збільшений об'єм вільної інтрацелюлярної води стає додатковим джерелом кристалоутворення в період заморожування та рекристалізації інтрацелюлярних кристалів льоду у період спонтанного відтавання, які пошкоджують мембрану клітини, її ядро та органели, спричиняючи необоротні деструктивні зміни; теплофізичні властивості дистильованої H_2O за рахунок гідратації біологічної тканини, у т. ч. злякисної солідної пухлини, збільшують її холодопровідність, що дає змогу в коротший період часу кріофіксації досягати критичних температур у діапазоні мінусових значень в найвіддаленіших від робочої поверхні кріоаплікатора ділянках тканини.

Для введення дистильованої H_2O в пухлину ПЗ використовували звичайний шприц для ін'єкцій ємністю 20 мл, виготовлений з полімеру поліпропілену, який забезпечував його абсолютну прозорість, та голку виробництва NIPRO Corporation (Японія) з тригранним атравматичним

лазерним заточенням та силіконовим покриттям довжиною 38 мм і діаметром 0,7 мм. Під контролем інтраопераційної ультрасонографії голку вводили в пухлинну тканину, спочатку інфільтруючи задні її відділи, потім – центральні та передню частини. Перед кожним введенням в пухлину дистильованої H_2O виконували часткову аспірацію, шляхом зворотної тракції поршня шприца з метою уникнення потрапляння її безпосередньо в судинне русло. За відсутності крові в шприці – локалізацію голки оцінювали як таку, що знаходиться в інтерстиціальному просторі пухлини, поза просвітом судинної стінки, що дозволяло розпочинати введення дистильованої H_2O .

Повільно в пухлину вводили розрахований за формулою об'єм дистильованої H_2O (рис. 6.1).

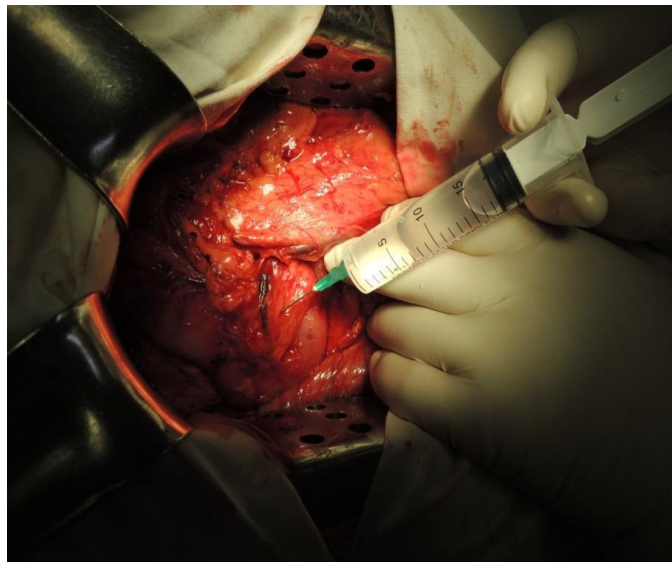


Рис. 6.1. Введення в резектабельну злоякісну солідну пухлину головки ПЗ дистильованої H_2O для потенціювання процесу кріофіксації.

Голку видаляли з пухлини, фіксуючи час експозиції, необхідний для достатнього осмотичного набряку пухлинних клітин, що повинен складати не менше 5 хв (час експозиції розраховано під час експериментального дослідження (див. розділ 3) на моделі перещепленої карциноми Герена). Кріофіксацію пухлини головки ПЗ проводили прямим контактним способом шляхом прикладання до її поверхні кріоаплікатора діаметром 30 мм з

комплекту універсальної кріохірургічною установки «Кріо-Пульс» (рис. 6.2) за робочої температури аплікатора, що складала $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$.

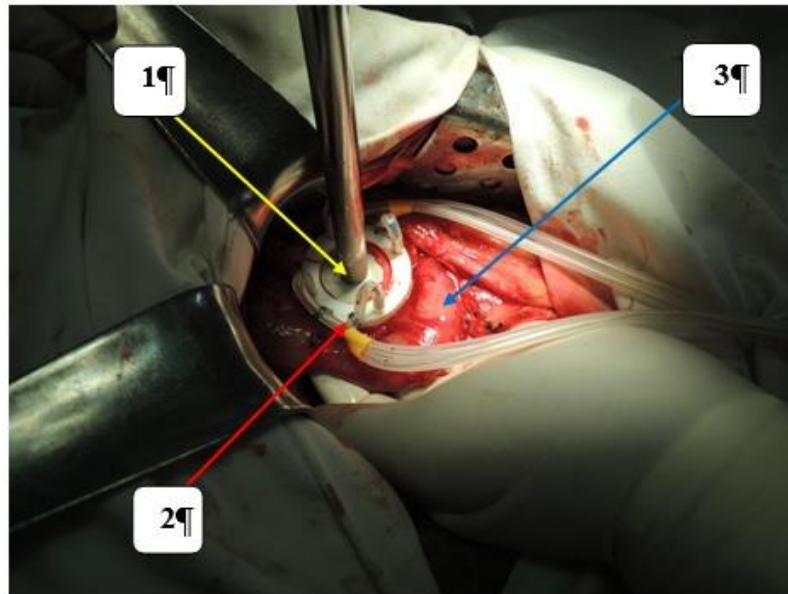


Рис. 6.2. Етап періоду заморозки циклу кріофіксації пухлини головки ПЗ, потенційованого дистильованою H_2O :

- 1 – кріоаплікатор діаметром 30 мм установки «Кріо-Пульс»;
- 2 – комплекс вимірювальний інтраопераційний термопарний чотириканальний (КВІТ-4);
- 3 – головка ПЗ з пухлиною.

Тривалість періоду заморозки циклу кріофіксації пухлини у кожного хворого встановлювалась індивідуально. Критерій ефективності проведення кріофіксації є досягнення температур у діапазоні мінусових значень в найбільш віддаленій ділянці пухлини (задня частина) щодо робочої поверхні кріоаплікатора за показниками встановленої мідь-константової термопари. Період відтавання циклу кріофіксації завжди спонтанний.

Після завершення кріофіксації пухлини головки ПЗ проводили мобілізацію дванадцятипалої кишки за Кохером (рис. 6.3) та виконували класичні етапи панкреатодуоденальної резекції за Whipple.

Реконструктивний етап операції полягав у формуванні інвагінаційного панкреато-, гепатикоеюноанастомозу, гастроентероанастомозу на єдиній

петлі. Встановлювали назоінтестинальний зонд для ентерального харчування у відвідну петлю *jejunum*, декомпресійний зонд – у шлунок. Черевну порожнину санували розчинами антисептиків. Встановлювали силіконові двопрорітні дренажі до сформованих анастомозів. Фізіологічно укладали петлі тонкого кишківника. Рану пошарово ушивали.

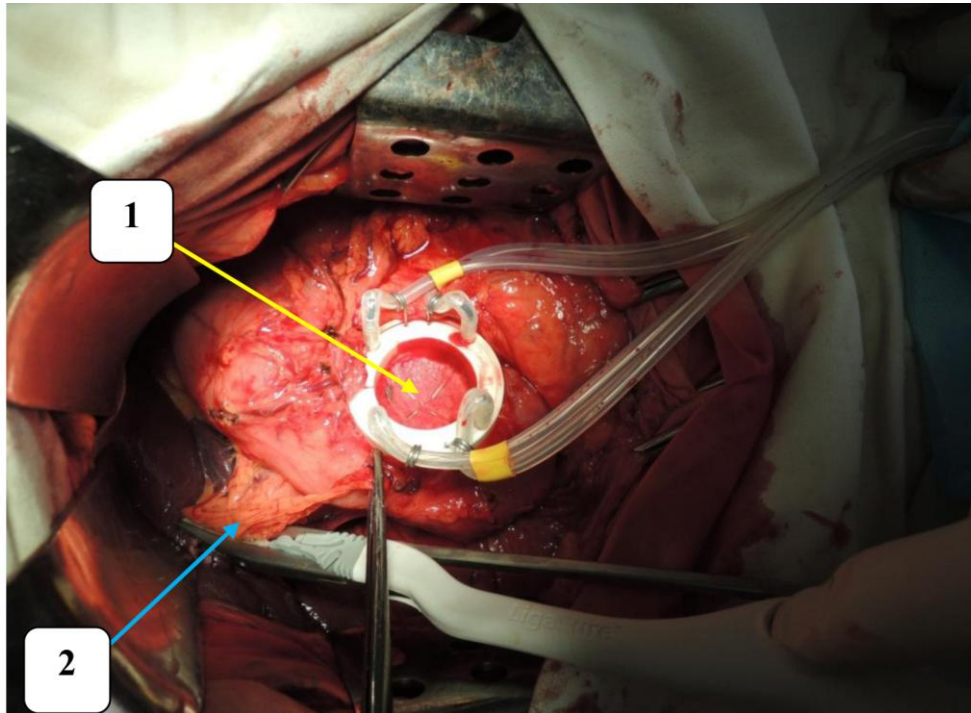


Рис. 6.3. Етап періоду спонтанного відтавання, сформованого *ice-ball*, циклу кріофіксації пухлини головки ПЗ, потенційованого дистильованою H_2O з одночасним початком виконання мобілізації дванадцятипалої кишки за Кохером: 1 – сформований *ice-ball* (передня поверхня головки ПЗ); 2 – мобілізація дванадцятипалої кишки за Кохером із застосуванням апарата LigaSure.

Приклад клінічного застосування запропонованого способу.

На клінічній базі кафедри загальної хірургії № 1 НМУ імені О. О. Богомольця в КМКЛ № 10 (м. Київ), Київському міському Центрі хірургії захворювань печінки, жовчних шляхів та підшлункової залози імені В. С. Земскова в 2016–2017 рр. було проліковано запропонованим способом 30 пацієнтів.

Хворий Г., 1949 р. н. (історія хвороби № 214771) був госпіталізований у клініку 10.03.2017 р. з діагнозом: рак головки ПЗ, T2Nx+M0, ст. ПБ, кл. гр. II. Post ендобіліарного стентування (27.02.17).

При госпіталізації – скарги на періодичні болі у верхніх відділах живота, тяжкість в епігастрії, схуднення на 5 кг за останні 6 міс.

При обстеженні: Нв – 122 г/л. L-крові – $8,3 \times 10^9$ /л. СА 19-9 – 17,5 од/мл, Білірубін загальний 26 мкмоль/л.

03.03.2017 р. хворому виконано магнітно-резонансну томографію органів черевної порожнини (МРТ ОЧП) з в/в введенням контрасту Tomovist-14 ml. На серії МРТ ОЧП підшлункова залоза у верхніх відділах головки обтурує інтрапанкреатичну частину CBD та MPD, визначається утворення неправильної округлої форми з нечіткими контурами розмірами $37 \times 30 \times 25$ мм. Утворення гіпоінтенсивне на T1 зважених зображеннях (33), ізоінтенсивне на T2 33 щодо іншої паренхіми залози. На серії DWI з наступним ADC-map з низьким коефіцієнтом дифузії, що свідчить про високу клітинну щільність на цьому рівні. При в/в контрастуванні утворення залишається гіподенсним у всі фази протоколу щодо інтактної паренхіми залози, з більш чіткою візуалізацією. Паренхіма дистальних відділів тіла і хвоста залози атрофована, з нерівномірним розширенням Вірсунгової протоки до 8 мм. Інвазії магістральних артерій та вен не виявлено. Збільшених, патологічно змінених регіонарних л/в, л/в заочеревинного простору та черевної порожнини не виявлено. Заключення: МР-картина утворення головки ПЗ, обумовленого з високою ймовірністю *pancreatic carcinoma*, з ознаками обструкції CBD і MPD. Даних за інвазію магістральних судин не виявлено. Даних за вторинне ураження ОЧП і заочеревинного простору не виявлено.

10.03.2017 р. під ендотрахеальним наркозом хворому виконано верхньосерединну лапаротомію. При ревізії ОЧП: асцити, канцероматозу не виявлено. Печінка візуально та пальпаторно без вогнищевої патології. Парааортальні л/в не збільшені. Розкрито сальникову сумку шляхом

пересічення *lig.gastrocolica*: тіло та хвіст підшлункової залози не змінені, пальпаторно – м'якої консистенції, зі збереженою часточковою структурою.

Враховуючи дані МРТ про відсутність інвазії пухлини головки ПЗ в магістральні судини, мобілізацію дванадцятипалої кишки за Кохером та пальпаторно-тракційні маніпуляції з пухлиною не проводили. Випадок визнано резектабельним.

За формулою $[V_{п.} = (a \times b \times c) \times K]$ розраховали об'єм пухлини. За даними МРТ ширина пухлини (a) складала 3,7 см, довжина (b) – 3,5 см, висота (c) – 2,5 см. $V_{п.} = (3,7 \times 3,5 \times 2,5) \times 0,52 = 14,43 \text{ см}^3$.

За формулою $[V_{д.в.} = V_{п.} \times 0,38]$ розраховали об'єм дистильованої H_2O , що необхідно ввести в пухлину для посилення процесу кріофіксації.

$$V_{д.в.} = 14,43 \times 0,38 = 5,48 \text{ мл}^3.$$

Під контролем інтраопераційної ультрасонографії вводили в пухлину $5,5 \text{ мл}^3$ дистильованої H_2O , інфільтруючи спочатку дорзальну її частину, потім – центральну та вентальну. Перед кожним введенням обов'язково виконували зворотну тракцію поршня шприца та виключали розміщення голки в просвіті магістральної судини з метою уникнення помилкового введення дистильованої H_2O в судинне русло. В якості дистильованої H_2O застосована стерильна «Вода для ін'єкцій». Після введення дистильованої H_2O – фіксували час експозиції, що складав 5 хв. Кріофіксацію пухлини головки підшлункової залози проводили прямим контактним способом, шляхом розміщення на її передній поверхні кріоаплікатора діаметром 30 мм з комплекту універсальної кріохірургічної установки «Кріо-Пульс». Температура робочої поверхні кріоаплікатора складала $-180 \text{ }^\circ\text{C}$. Інтраопераційну ефективність періоду заморожування циклу кріофіксації оцінювали в режимі реального часу за показниками температури мідь-константанових термопар Т-типу, встановлених у пухлину. Під час проведення кріофіксації реєстрували показники температури в пухлині на дискретних глибинах (3, 8, 13 та 18 мм) щодо робочої поверхні кріоаплікатора, застосовуючи комплекс вимірювальний інтраопераційний термопарний чотириканальний (КВІТ-4),

розроблений в 2015 р. сумісно кафедрою загальної хірургії № 1 НМУ імені О. О. Богомольця та НВФ «Пульс» (м. Київ) [18]. Додатково під контролем інтраопераційної ультрасонографії встановлювали п'яту мідь-константанову термопару в найвіддаленішій від робочої поверхні кріоаплікатора дорзальній частині пухлини (глибина 25 мм). Тривалість періоду заморожування циклу кріофіксації пухлини визначали часом досягнення критичного рівня температури в діапазоні мінусових значень за показниками п'ятої термопари, встановленої в найбільш віддаленій ділянці пухлини на глибині 25 мм (дорзальна частина) відносно робочої поверхні кріоаплікатора. В кінці 10-ї хв періоду заморожування циклу кріофіксації було зафіксовано температуру по показниках п'ятої термопари $-37,2$ °C, після чого виконувався відігрів кріоаплікатора та розпочинався період спонтанного відтавання утвореного *ice-ball* [19].

Виконували класичний варіант ПДР за Whipple, стандартну лімфаденектомію. Реконструктивний етап операції полягав у послідовному формуванні інвагінаційного панкреато-, гепатикоєюноанастомозу та гастроентероанастомозу на єдиній ретроколярній петлі. Проводили назоінтестинальний зонд для забезпечення ентерального харчування в ранньому післяопераційному періоді у відвідну петлю *jejunum*, декомпресійний зонд – у шлунок. Встановлювали силіконові двохпросвітні дренажі до сформованих анастомозів. Черевну порожнину санували розчинами антисептиків, осушували. Фізіологічно укладали петлі тонкого кишківника. Рану пошарово ушивали. Накладали асептичну пов'язку.

У видаленому макропрепараті розсікали головку підшлункової залози з пухлиною по умовній середній лінії, виконували забір матеріалу товщиною 5 мм по всій площині зрізу пухлини від її передньої до задньої поверхні (рис. 6.4). Маркували передню та задню поверхні зрізу пухлини для подальшого патогістологічного дослідження морфологічних змін на глибинах, що відповідали точкам встановлення термопар КВІТ-4 (3, 8, 13, 18 мм) та окремої п'ятої термопари (25 мм) – край задньої частини пухлини.

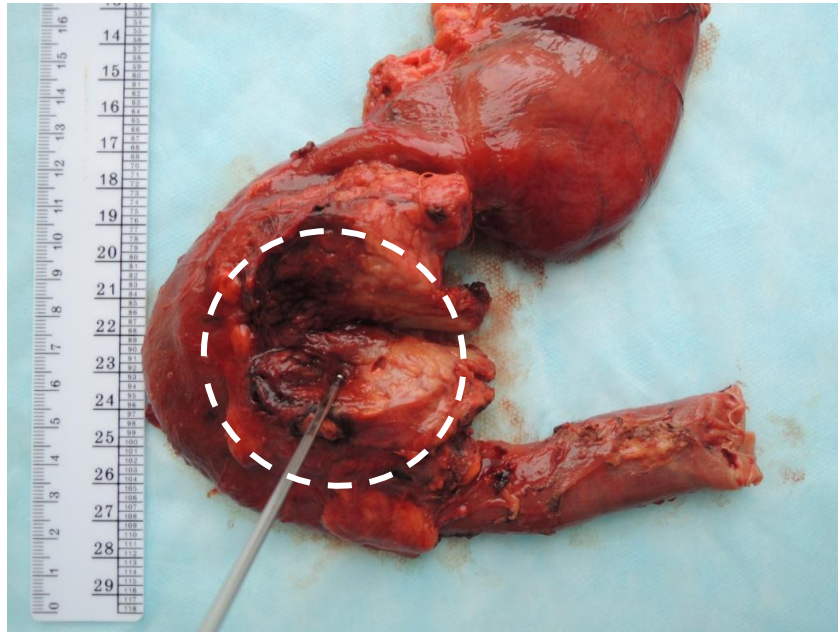
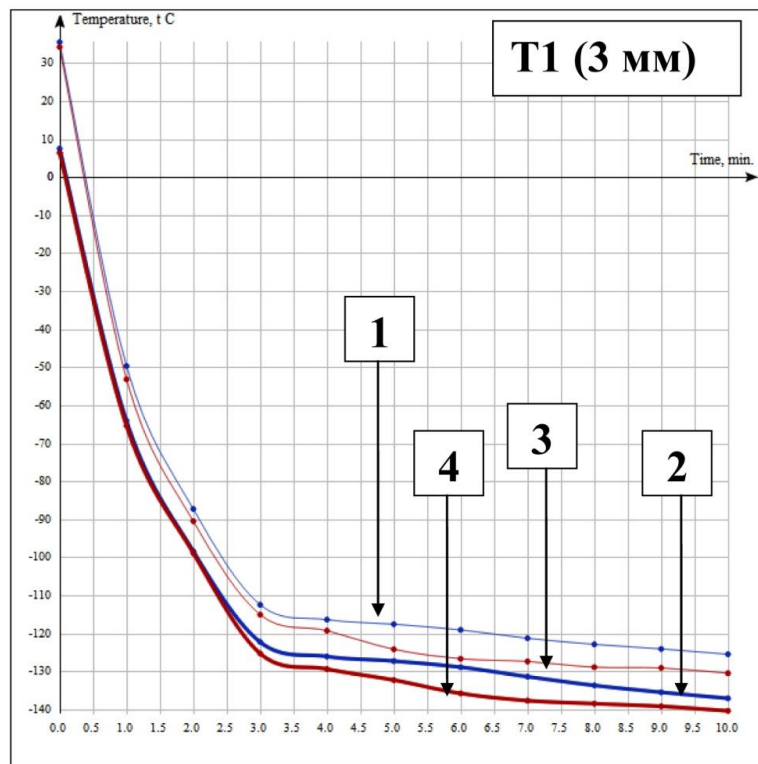


Рис. 6.4. Макропрепарат видаленого гастропанкреатодуоденального комплексу після двох циклів кріофіксації з розсіченою по середній лінії головкою ПЗ з пухлиною (позначена пунктирною лінією).

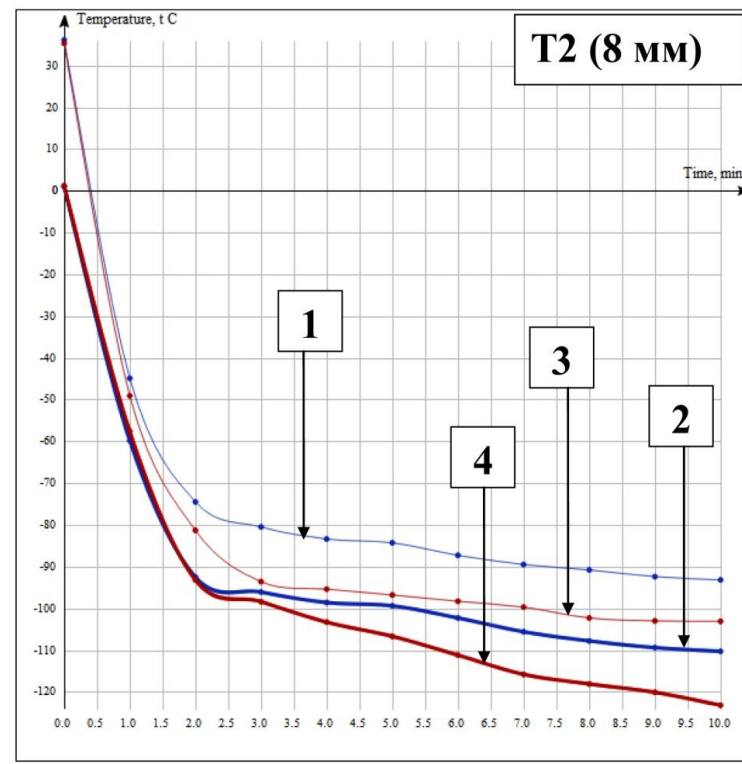
Динаміка зниження температури в резектабельній солідній злоякісній пухлині ПЗ під час кріофіксації подвійним циклом заморозки (тривалість одного циклу 10 хв), з кріопотенціюванням дистильованою H_2O , за показниками мідь-константанових термопар КВІТ-4 [22] на глибині 3, 8, 13 та 18 мм від робочої поверхні кріоаплікатора \varnothing 30 мм представлена у вигляді кривих-ізотерм на рисунках 6.5, 6.6.

Проведено порівняльний аналіз значень досягнутої середньої температури в пухлині ПЗ за показниками термопар Т1-Т4 КВІТ-4 в кінці 10-ї хв другого циклу кріофіксації між підгрупою $(K+P)_I$ групи порівняння та підгрупою $(D+K+P)_I$ основної групи хворих (табл. 6.1).

Впроваджений спосіб кріопотенціювання шляхом попереднього введення в резектабельну злоякісну солідну пухлину головки ПЗ дистильованої H_2O дозволяє досягати під час кріофіксації температур в діапазоні мінусових значень на всіх дослідних глибинах (3, 8, 13, 18 мм), що у відсотковому співвідношенні на $(111,4 \pm 20,1) \%$ нижчі в підгрупі $(D+K+P)_I$ порівняно з підгрупою $(K+P)_I$.



А

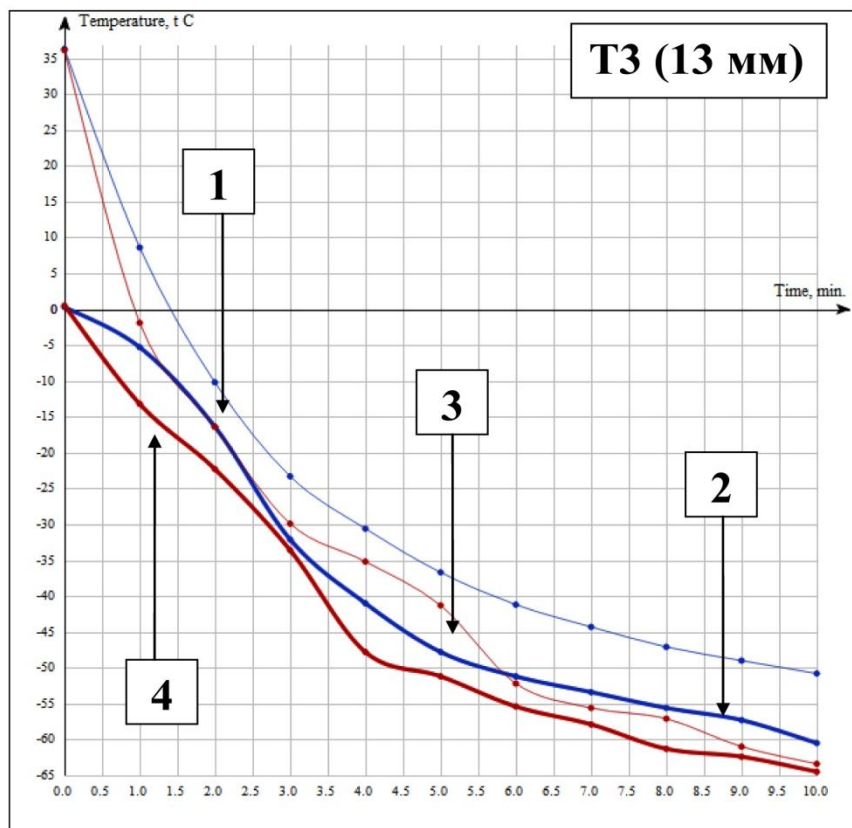


Б

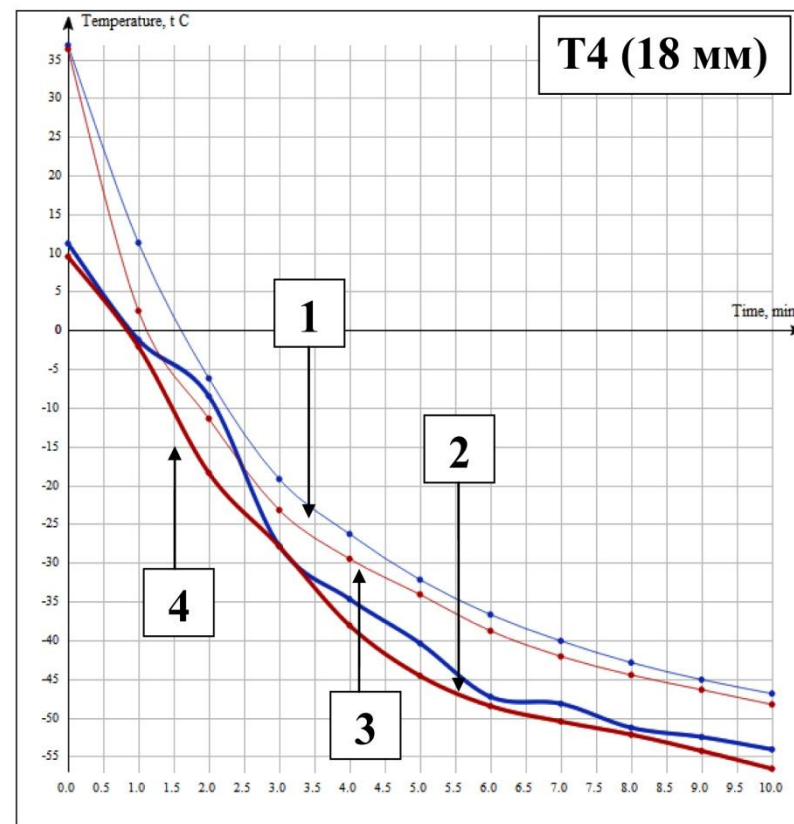
Рис. 6.5. Динаміка зниження температури в пухлині ПЗ під час кріофіксації подвійним циклом заморозки, з кріопотенціюванням дистильованою H_2O : 1 – крива динаміки зниження температур (перший цикл заморозки) в підгрупі (Д+К+Р)_I; 2 – крива динаміки зниження температур (другий цикл заморозки) в підгрупі (Д+К+Р)_I; 3 – крива динаміки зниження температур (перший цикл заморозки) в підгрупі (Д+К+Р)_{II}; 4 – крива динаміки зниження температур (другий цикл заморозки) в підгрупі (Д+К+Р)_{II}:

А – за показниками терморпарі Т1 на глибині 3 мм від поверхні кріоаплікатора;

Б – за показниками терморпарі Т2 на глибині 8 мм від поверхні кріоаплікатора.



А



Б

Рис. 6.6. Динаміка зниження температури в пухлині ПЗ під час криофіксації подвійним циклом заморозки, з криопотенціюванням дистильованою H_2O : 1 – крива динаміки зниження температур (перший цикл заморозки) в підгрупі (Д+К+Р)_I; 2 – крива динаміки зниження температур (другий цикл заморозки) в підгрупі (Д+К+Р)_I; 3 – крива динаміки зниження температур (перший цикл заморозки) в підгрупі (Д+К+Р)_{II}; 4 – крива динаміки зниження температур (другий цикл заморозки) в підгрупі (Д+К+Р)_{II}:

А – за показниками термопар Т3 на глибині 13 мм від поверхні криоаплікатора;

Б – за показниками термопар Т4 на глибині 18 мм від поверхні криоаплікатора.

Таблиця 6.1

Порівняльний аналіз значень $t_{\text{сер.}}$ ($^{\circ}\text{C}$), досягнутих в кінці 10-ї хв другого циклу кріофіксації за показниками КВІТ-4 в резектабельній пухлині проксимального відділу ПЗ без потенціювання (підгрупа $(\text{K}+\text{P})_{\text{I}}$) та з потенціюванням дистильованою H_2O (підгрупа $(\text{D}+\text{K}+\text{P})_{\text{I}}$)

| Термопара (мм) | Середня температура в пухлині ($t_{\text{сер.}}$, $^{\circ}\text{C}$) | | В скільки разів $t_{\text{сер.}}$ $(\text{D}+\text{K}+\text{P})_{\text{II}} >$ $(\text{K}+\text{P})_{\text{II}}$ | На скільки % $t_{\text{сер.}}(\text{D}+\text{K}+\text{P})_{\text{II}} >$ $(\text{K}+\text{P})_{\text{II}}$ |
|-------------------|---|---|--|--|
| | $(\text{K}+\text{P})_{\text{I}}$ | $(\text{D}+\text{K}+\text{P})_{\text{I}}$ | | |
| T1 (3 мм) | -54,7 | -137,1* | 1,9 | 92,2 |
| T2 (8 мм) | -30,2 | -110,3* | 2,2 | 122,1 |
| T3 (13 мм) | -12,9 | -60,5* | 2,0 | 97,1 |
| T4 (18 мм) | 2,3 | -54,1* | 2,3 | 134,3 |

Примітка. * – $p < 0,05$ – достовірність різниці $t_{\text{сер.}}(\text{D}+\text{K}+\text{P})_{\text{I}}$ в порівняно з $(\text{K}+\text{P})_{\text{I}}$

При цьому значення $t_{\text{сер.}}$ в підгрупі $(\text{D}+\text{K}+\text{P})_{\text{I}}$ основної групи достовірно нижчі порівняно з підгрупою $(\text{K}+\text{P})_{\text{I}}$ групи порівняння на рівні значущості $p < 0,05$ по всіх дослідних глибинах (3, 8, 13, 18 мм).

Введення дистильованої H_2O в резектабельну зляжісну пухлину головки ПЗ за 5 хв до початку локальної кріодії (підгрупа $(\text{D}+\text{K}+\text{P})_{\text{I}}$) дозволяє в кінці 10-ї хв другого циклу кріофіксації досягати температури в діапазоні мінусових значень, що в середньому в $(2,1 \pm 0,2)$ рази перевищує значення температур, де кріопотенціювання не застосовували (підгрупа $(\text{K}+\text{P})_{\text{I}}$).

Ідентичний з наведеним порівняльний аналіз значень досягнутої середньої температури в пухлині ПЗ за показниками термопар T1–T4 КВІТ-4 в кінці 10-ї хвилини другого циклу кріофіксації було проведено між підгрупою $(\text{K}+\text{P})_{\text{II}}$ групи порівняння та підгрупою $(\text{D}+\text{K}+\text{P})_{\text{II}}$ основної групи хворих, що представлено в таблиці 6.2. Було встановлено, що попереднє введення дистильованої H_2O в резектабельну зляжісну солідну пухлину дистального відділу ПЗ дозволяє досягати під час кріофіксації температур у діапазоні мінусових значень також на всіх дослідних глибинах (3, 8, 13, 18 мм), що у відсотковому співвідношенні на $(91,1 \pm 22,3)$ % нижчі в підгрупі $(\text{D}+\text{K}+\text{P})_{\text{II}}$ порівняно з підгрупою $(\text{K}+\text{P})_{\text{II}}$.

Таблиця 6.2

Порівняльний аналіз значень $t_{\text{сер.}}$ ($^{\circ}\text{C}$), досягнутих в кінці 10-ї хв другого циклу кріофіксації за показниками КВІТ-4 в резектабельній пухлині дистальних відділів ПЗ без потенціювання (підгрупа (К+Р)_{II}) та з потенціюванням дистильованою Н₂О (підгрупа (Д+К+Р)_{II})

| Термопара (мм) | Середня температура в пухлині ($t_{\text{сер.}}$, $^{\circ}\text{C}$) | | В скільки разів $t_{\text{сер.}}$ (Д+К+Р) _{II} > (К+Р) _{II} | На скільки % $t_{\text{сер.}}$ (Д+К+Р) _{II} > (К+Р) _{II} |
|-------------------|---|-----------------------|---|--|
| | (К+Р) _{II} | (Д+К+Р) _{II} | | |
| T1 (3 мм) | -70,1 | -140,4* | 1,6 | 67,7 |
| T2 (8 мм) | -41,3 | -123,2* | 2,0 | 106,4 |
| T3 (13 мм) | -20,6 | -64,5* | 1,7 | 76,8 |
| T4 (18 мм) | -6,7 | -56,6* | 2,1 | 113,5 |

Примітка. * – $p < 0,05$ – достовірність різниці $t_{\text{сер.}}$ (Д+К+Р)_{II} порівняно з (К+Р)_{II}

При цьому значення $t_{\text{сер.}}$ в підгрупі (Д+К+Р)_{II} основної групи достовірно нижчі порівняно з підгрупою (К+Р)_I групи порівняння на рівні значущості $p < 0,05$ по всіх дослідних глибинах (3, 8, 13, 18 мм).

Введення дистильованої Н₂О в резектабельну зляжкісну солідну пухлину дистального відділу ПЗ за 5 хв до початку локальної кріодії (підгрупа (Д+К+Р)_{II}) дозволяє в кінці 10-ї хв другого циклу кріофіксації досягати температур в діапазоні мінусових значень, що в середньому в $(1,85 \pm 0,24)$ рази перевищує значення температур, де кріопотенціювання не застосовувалось (підгрупа (К+Р)_{II}).

Методологія морфологічного дослідження гістологічних препаратів зрізів пухлинної тканини ПЗ на дослідних глибинах (3, 8, 13, 18 мм) від її передньої поверхні не відрізнялась від описаної в розділі 5.

При програмній обробці мікропрепаратів QuickPhoto Micro 2.3 в автоматичному режимі було встановлено, що у 100 % пухлинних клітин реалізовано механізм необоротного первинного кріопошкодження (рис. 6.7А), як на глибині зрізу 3, 8, 13, так і 18 мм від передньої поверхні

пухлини незалежно від локалізації її в проксимальному чи дистальному відділі ПЗ. При цьому у всіх полях зору мікропрепарату спостерігались мікротромбози судин та виражений набряк строми пухлини (рис. 6.7Б).

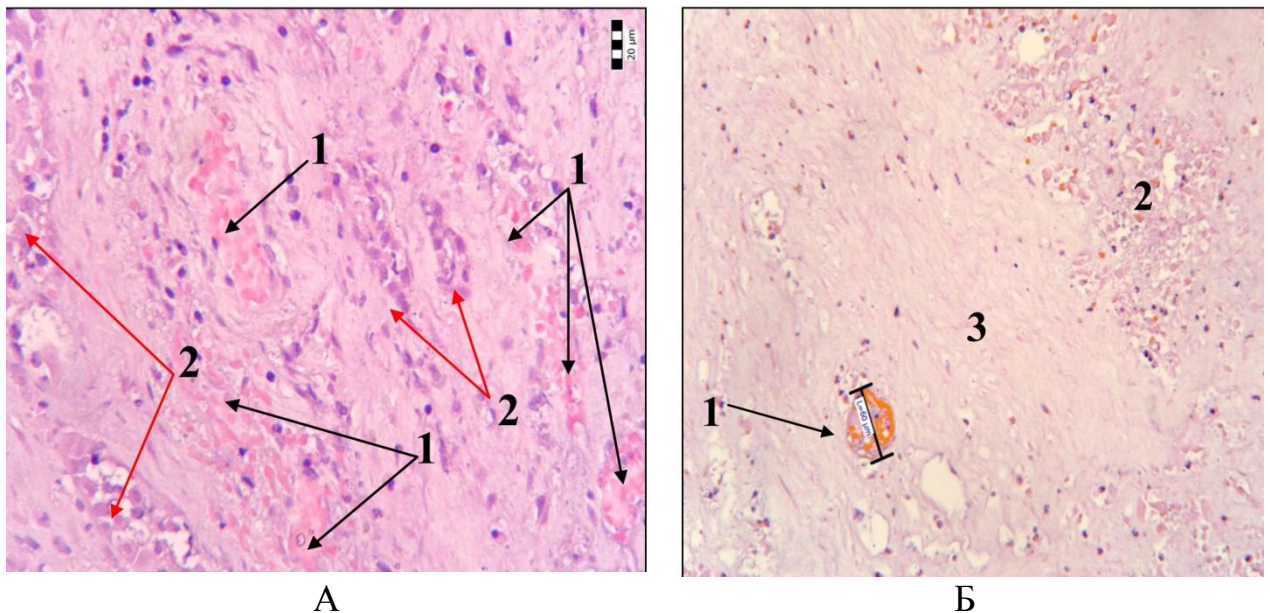


Рис. 6.7. Протокова аденокарцинома головки ПЗ після двох циклів кріофіксації пухлини з потенціюванням дистильованою H_2O . Забарвлення гематоксилін-еозином. Зб. $\times 200$:

А – глибина – 18 мм від поверхні пухлини. У просвіті судин мікроциркуляторного русла пухлинної тканини ПЗ візуалізуються мікротромби: 1 – судини з тромбами; 2 – залози аденокарциноми з необоротними дистрофічними змінами і некрозом клітин;

Б – глибина – 25 мм від поверхні пухлини: 1 – судина з тромбом; 2 – пухлинні клітини з незворотними змінами – некроз, некробіоз 100 %; 3 – набряк строми.

Висновки

1. Введення в резектабельну солідну зляжісну пухлину ПЗ дистильованої H_2O за 5 хв до початку процесу кріофіксації чинить потенціуючий ефект, що проявляється досягненням більш низьких температур за показниками термопар Т1–Т4 КВІТ-4, у т. ч. в найбільш віддалених від робочої поверхні кріоаплікатора ділянках.

2. При локалізації пухлини в проксимальному відділі ПЗ потенціювання процесу кріофіксації дистильованою H_2O дозволяє отримувати середні

температури в діапазоні мінусових значень в кінці 10-ї хв другого циклу заморозки, що в $(2,1 \pm 0,2)$ рази перевищують значення температур, де кріопотенціювання не застосовували.

3. При локалізації пухлини в дистальному відділі ПЗ потенціювання процесу кріофіксації дистильованою H_2O дозволяє отримувати середні температури в діапазоні мінусових значень в кінці 10-ї хв другого циклу заморозки, що в $(1,85 \pm 0,24)$ рази перевищують значення температур, де кріопотенціювання не застосовували.

4. Кріофіксація резектабельної солідної злоякісної пухлини ПЗ, потенційована попереднім введенням в неї дистильованої H_2O , із застосуванням кріоаплікатора \varnothing 30 мм та проведенням подвійного циклу заморозки з часом експозиції одного циклу 10 хв та наступним спонтанним відтаванням після кожного циклу, дозволяє гарантовано отримувати необоротні деструктивні зміни у 100 % пухлинних клітин унаслідок ефекту первинного кріопошкодження, а також мікротромбозів у судинах мікроциркуляторного русла пухлини у всіх ділянках її об'єму.

Основні положення розділу 6 показано в працях автора [19], [22].

РОЗДІЛ 7**ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА КЛІНІЧНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ
ХІРУРГІЧНОГО ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ З НЕЗАПАЛЬНИМИ
ЗАХВОРЮВАННЯМИ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ІЗ
ЗАСТОСУВАННЯМ МЕТОДУ КРІОФІКСАЦІЇ****7.1. Порівняльний аналіз безпосередніх результатів хірургічного лікування хворих з резектабельною протоковою аденокарциномою підшлункової залози із застосуванням методу кріофіксації**

Нами було проведено кількісний аналіз безпосередніх результатів лікування хворих з НЗПЗ у вигляді порівняння між групою порівняння (Р), групою порівняння (К+Р) та основною групою (Д+К+Р).

Безпосередні ранні післяопераційні результати лікування оцінювали за наступними показниками: тривалість оперативного втручання (хв); об'єм інтраопераційної крововтрати (мл); чи проводилась гемотрансфузія під час операції та її об'єм; тривалість перебування хворого в реанімації після операції (доба); доба, на яку з'явилась активна перистальтика; частота та характер післяопераційних ускладнень; частота та причини релапаротомії (повторне оперативне втручання протягом 30 днів після первинної операції); кількість післяопераційних ліжко-днів; післяопераційна летальність (табл. 7.1). Класифікацію післяопераційних ускладнень проводили за шкалою Clavien-Dindo [81]. Згідно з даною класифікацією усі ускладнення були умовно розподілені на два типи: легкі, що не потребували хірургічного втручання та не були загрозливими для життя хворого (ступінь I–II); тяжкі ускладнення, що викликали загрозу життя для хворого та потребували інвазивних втручань (ступінь III–IV); у випадку смерті хворого в стаціонарі в 30-ти денний термін після радикальної резекції ПЗ, включали останнього до ступеня V згідно з Clavien-Dindo.

Таблиця 7.1

**Порівняльний аналіз безпосередніх результатів лікування хворих на
НЗПЗ в групах (Р), (К+Р) та (Д+К+Р)**

| Показник | Всього хворих n=97 | Група | | | p |
|--|-----------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------|
| | | (Р) n=46 | (К+Р) n=21 | (Д+К+Р) n=30 | |
| Тривалість операції, хв | 364 ± 9,1 | 372,8 ± 16,2 | 370,4 ± 13,5 | 346 ± 12,9 | 0,422 |
| Об'єм крововтрати, мл | 478,4 ± 44,7 | 578,3 ± 81,3 | 331 ± 41,8 | 428,3 ± 60,7 | 0,077 |
| Інтраопераційна гемотрансфузія, n (%) | 22 (22,7) | 12 (26) | 2 (9,5) | 8 (26,6) | 0,266 |
| Об'єм інтраопераційної гемотрансфузії, мл | 334,8 ± 31 | 339,4 ± 43,9 | 267,5 ± 12,5 | 344,8 ± 56,9 | 0,805 |
| Тривалість перебування в реанімації, дні, медіана; (95 % ВІ) | 4 ± 0,3; 3–5 | 4 ± 0,6; 3–5 | 4 ± 0,3; 3–5 | 4 ± 0,5; 3–5 | 0,449 |
| Поява активної перистальтики, доба, медіана; (95 % ВІ) | 3 ± 0,15; 2–4 | 3 ± 0,2; 2–4 | 4 ± 0,3;* 3–5 | 4 ± 0,25;** 3–5 | <0,001 |
| Релапаротомія, n (%) | 12 (12,4) | 7 (15,2) | 1 (4,7) | 4 (13,3) | 0,474 |
| Післяопераційний (п/о) ліжко-день, медіана; (95 % ВІ) | 20 ± 1,4 18–22 | 21 ± 2,5 17–23 | 21 ± 1,0 17–23 | 19 ± 2,3 17–22 | 0,883 |
| П/о ускладнення, n (%) | 40 (41,2) | 21 (45,7) | 8 (38,1) | 11 (36,7) | 0,700 |
| Післяопераційна летальність, n (%) | 7 (7,2) | 4 (8,7) | 1 (4,8) | 2 (6,7) | 0,84 |

Примітки:

* – достовірна різниця показника в групі (К+Р) порівняно з (Р);

** – достовірна різниця показника в групі (Д+К+Р) порівняно з (Р).

При проведенні множинних порівнянь для 3 вибірок (групи (Р), (К+Р) та (Д+К+Р), за ранговим однофакторним аналізом Крускала-Уолліса було виявлено достовірну різницю на рівні значущості $p < 0,001$ показника доби появи активної перистальтики.

Наводимо дані порівняння між групами за показником доби появи активної перистальтики в групах:

- (P), (K+P): (Q=4,26), різниця є достовірною на рівні значущості $p < 0,01$;
- (P), (Д+K+P): (Q=3,41), різниця є достовірною на рівні значущості $p < 0,01$.
- (K+P), (Д+K+P): (Q=1,09), різниця не є достовірною, $p > 0,05$.

Таким чином, можна зробити висновок, що в групах пацієнтів (K+P) та (Д+K+P) активна перистальтика достовірно з'являється на 1 добу пізніше, ніж у групі (P). Медіана п/о ліжко-дня загалом по всій вибірці хворих на НЗПЗ (n=97) склала $(20 \pm 1,4)$ діб (95 % ВІ: 18–22 діб). При порівнянні показника п/о ліжко-дня між групами (P), (K+P) та (Д+K+P) достовірної різниці не виявлено. Додатково було проведено порівняння частоти розподілу хворих у підгрупах груп порівняння (P), (K+P) та основної групи (Д+K+P) за показником тривалості перебування в стаціонарі, що перевищувала 20 діб (рис. 7.1).

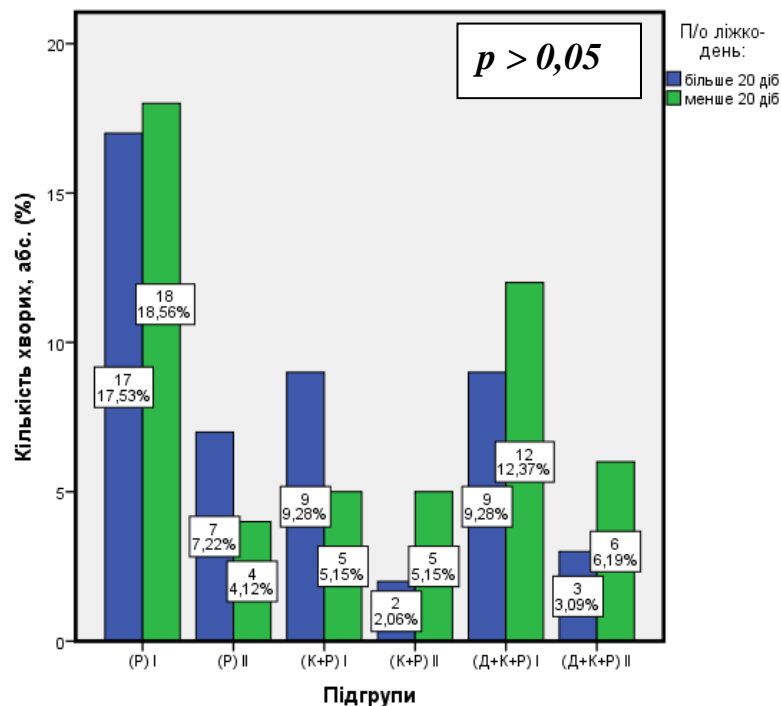


Рис. 7.1. Порівняльний аналіз частоти розподілу хворих на НЗПЗ в підгрупах за показником п/о ліжко-дня, що перевищив 20 діб.

При порівнянні частоти розподілу хворих в підгрупах (P)_I, (K+P)_I та (Д+K+P)_I, яким виконувалась проксимальна резекція ПЗ, достовірної різниці показника перебування в стаціонарі, що перевищувала 20 діб, виявлено не

було ($p=0,449$; $\chi^2=1,6$).

При порівнянні частоти розподілу хворих у підгрупах (P)_{II}, (K+P)_{II} та (D+K+P)_{II}, яким виконувалась дистальна резекція ПЗ, достовірної різниці показника перебування в стаціонарі, що перевищувала 20 діб (рис. 7.1), не було виявлено також ($p=0,246$; $\chi^2=2,81$).

Отже, можна зробити висновок, що застосування методу кріофіксації резектабельної солідної злоякісної пухлини ПЗ, як у поєднанні з потенціюванням дистильованою H₂O, так і без кріопотенціювання, незалежно від типу резекції залози достовірно не впливає на показник перебування хворого в стаціонарі, що перевищує 20 діб, порівняно з групою хворих, яким виконували класичний варіант резекції ПЗ.

Післяопераційна летальність загалом по всій вибірці хворих з 2010 по 2017 р. включно склала 7 (7,2 %). З числа хворих, яким виконувалась проксимальна резекція ПЗ летальність склала 8,6 % (6 з 70 хворих).

З числа хворих, яким виконувався дистальний тип резекції ПЗ летальність склала 3,7 % (1 з 27 хворих). При цьому варто відмітити, що з 2011 по 2015 р. включно післяопераційна летальність після виконання ПДР була відсутня.

В групі порівняння (P) показник післяопераційної летальності склав 4 (8,7 %). У всіх чотирьох випадках післяопераційної летальності в групі порівняння (P) хворим було проведено ПДР. В групі порівняння (K+P) в післяопераційному періоді помер один хворий, якому була виконана дистальна резекція ПЗ. Таким чином післяопераційна летальність в групі порівняння (K+P) склала 1 (4,8 %).

В основній групі хворих (D+K+P) в післяопераційному періоді померло 2 хворих, летальність склала 6,7 %.

При попарному порівнянні долі хворих у яких настала летальність в післяопераційному періоді в трьох групах (P), (K+P) та (D+K+P) було застосовано метод кутового перетворення Фішера і отримано наступні результати:

– група порівняння (P): доля (D) хворих, що померли в післяопераційному періоді з 46 всіх оперованих хворих в групі склала 8,7 % (інтервальна оцінка: $2,3 \% \leq D \leq 18,8 \%$ на рівні значущості $p=0,05$;

– група порівняння (K+P): доля (D) хворих, що померли в післяопераційному періоді з 21 оперованого хворого в групі склала 4,8 % (інтервальна оцінка: $0,0 \% \leq D \leq 18,7 \%$ на рівні значущості $p=0,05$;

– основна група (D+K+P): доля (D) хворих, що померли в післяопераційному періоді з 30 всіх оперованих хворих в групі склала 6,7 % (інтервальна оцінка: $0,6 \% \leq D \leq 18,8 \%$ на рівні значущості $p=0,05$.

Для попарного порівняння долі пацієнтів, що померли в післяопераційному періоді між трьома групами, на першому етапі було вивчено питання стосовно наявності відмінностей між групами в цілому, для чого було використано критерій χ^2 . Отримано $\chi^2_{\text{факт.}}=0,35$, число ступенів вільності $k=2$.

Різниця частоти післяопераційної летальності між групами (P), (K+P), (D+K+P) не є достовірною на рівні значущості, $p=0,838$.

Отже, можна зробити висновок, що оптимізація методу криофіксації резектабельної солідної злоякісної пухлини ПЗ шляхом потенціювання процесу локальної криодії попереднім введенням в пухлину дистильованої H_2O не погіршує показник післяопераційної летальності.

Частота післяопераційних ускладнень в групах порівняння (P), (K+P) та основній (D+K+P) групах представлена в таблиці 7.2.

Таблиця 7.2

Частота післяопераційних ускладнень в групі (P), (K+P) та (D+K+P)

| Ускладнення | Група хворих (n=97) | | | | | | Загалом | |
|-------------|---------------------|-------|-----------|-------|-------------|-------|---------|-------|
| | P, n=46 | | K+P, n=21 | | D+K+P, n=30 | | | |
| | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Так | 21 | 45,7 | 8 | 38,1 | 11 | 36,7 | 40 | 41,2 |
| Ні | 25 | 54,3 | 13 | 61,9 | 19 | 63,3 | 57 | 58,8 |
| Разом | 46 | 100,0 | 21 | 100,0 | 30 | 100,0 | 97 | 100,0 |

При попарному порівнянні долі хворих у яких розвинулись в п/о періоді ускладнення в трьох групах (Р), (К+Р) та (Д+К+Р) було застосовано метод кутового перетворення Фішера і отримано наступні результати:

– група порівняння (Р): доля (D) хворих, у яких розвинулись в п/о періоді ускладнення з 46 всіх оперованих хворих в групі склала 45,7 % (інтервальна оцінка: 31,3 % $\leq D \leq$ 60,4 % на рівні значущості $p=0,05$;

– група порівняння (К+Р): доля (D) хворих, у яких розвинулись в п/о періоді ускладнення з 21 оперованого хворого в групі склала 38,1 % (інтервальна оцінка: 18,0 % $\leq D \leq$ 60,7 % на рівні значущості $p=0,05$;

– основна група (Д+К+Р): доля (D) хворих, у яких розвинулись в п/о періоді ускладнення з 30 всіх оперованих хворих в групі склала 36,7 % (інтервальна оцінка: 20,0 % $\leq D \leq$ 55,2 % на рівні значущості $p=0,05$;

Для попарного порівняння долі пацієнтів, у яких розвинулись в п/о періоді ускладнення між трьома групами, на першому етапі було вивчено питання стосовно наявності відмінностей між групами в цілому, для чого було використано критерій χ^2 . Отримано $\chi^2_{\text{факт.}}=0,71$, число ступенів вільності $k=2$. Різниця частоти післяопераційних ускладнень між групами (Р), (К+Р), (Д+К+Р) не є достовірною на рівні значущості, $p=0,700$. Таким чином можна зробити висновок, що оптимізація методу кріофіксації резектабельної солідної злоякісної пухлини ПЗ шляхом потенціювання процесу локальної кріодії попереднім введенням в пухлину дистильованої H_2O не погіршує та не поліпшує показник частоти п/о ускладнень.

7.2. Порівняльний аналіз віддалених результатів хірургічного лікування хворих з резектабельною протоковою аденокарциномою підшлункової залози між групами (Р), (К+Р) та (Д+К+Р)

Враховуючи особливості дизайну нашого дослідження, а саме його етапність, що передбачала послідовний набір хворих в групу порівняння (Р) в період з 2010 по 2015 рр, групу порівняння (К+Р) в період з 2015 по 2016 р.

та основну групу (Д+К+Р) в період з 2016 по 2017 р. включно – аналіз віддалених результатів лікування між всіма групами можливо було провести в терміни спостереження 12, 18 та 24 місяці.

Враховуючи те, що загалом по всій вибірці хворих на НЗПЗ (n=97), що були включені в дослідження в період з 2010 по 2017 рр. показник післяопераційної летальності склав 7,2 %, то віддалені результати лікування були відстежені в 90 з 97 хворих.

Ймовірність кумулятивної виживаності (Kaplan-Meier) між групами хворих на НЗПЗ (Р), (К+Р) та (Д+К+Р) в термін спостереження 12 міс. (рис. 7.2А). В групі порівняння (Р) вона склала 63,1 %, групі порівняння (К+Р) – 65 %, основній групі (Д+К+Р) – 89,3 %. Не дивлячись на те, що в основній групі (Д+К+Р), ймовірність виживаності хворих в термін спостереження 12 міс на 26,2 % перевищує відповідний показник в групі порівняння (Р) та на 24,3 % в групі порівняння (К+Р) достовірної різниці між трьома групами не виявлено ($\chi^2=5,75$; $p=0,056$).

В наступному нами було проведено порівняння показника ймовірності кумулятивної виживаності в термін спостереження 12 міс. кожної з груп порівняння (Р), (К+Р) окремо з основною групою (Д+К+Р). При порівнянні групи порівняння (Р) з основною групою (Д+К+Р) показник ймовірності кумулятивної виживаності для яких складав 63,1 та 89,3 % відповідно, було встановлено достовірну різницю ($\chi^2=5,51$; $p=0,02$) (рис. 7.2Б).

При порівнянні групи порівняння (К+Р) з основною групою (Д+К+Р) показник ймовірності кумулятивної виживаності для яких складав 65 та 89,3 % відповідно, в термін спостереження 12 міс. статистично значущої різниці встановлено не було ($\chi^2=3,83$; $p=0,049$) (рис. 7.3А). Також було проведено порівняння між двома групами порівняння (Р) та (К+Р) по показнику кумулятивної виживаності в термін 12 міс. спостереження, для яких останній складав 63,1 та 65 % відповідно. Достовірної різниці виявлено не було ($\chi^2=0,08$; $p=0,77$) (рис. 7.3Б).

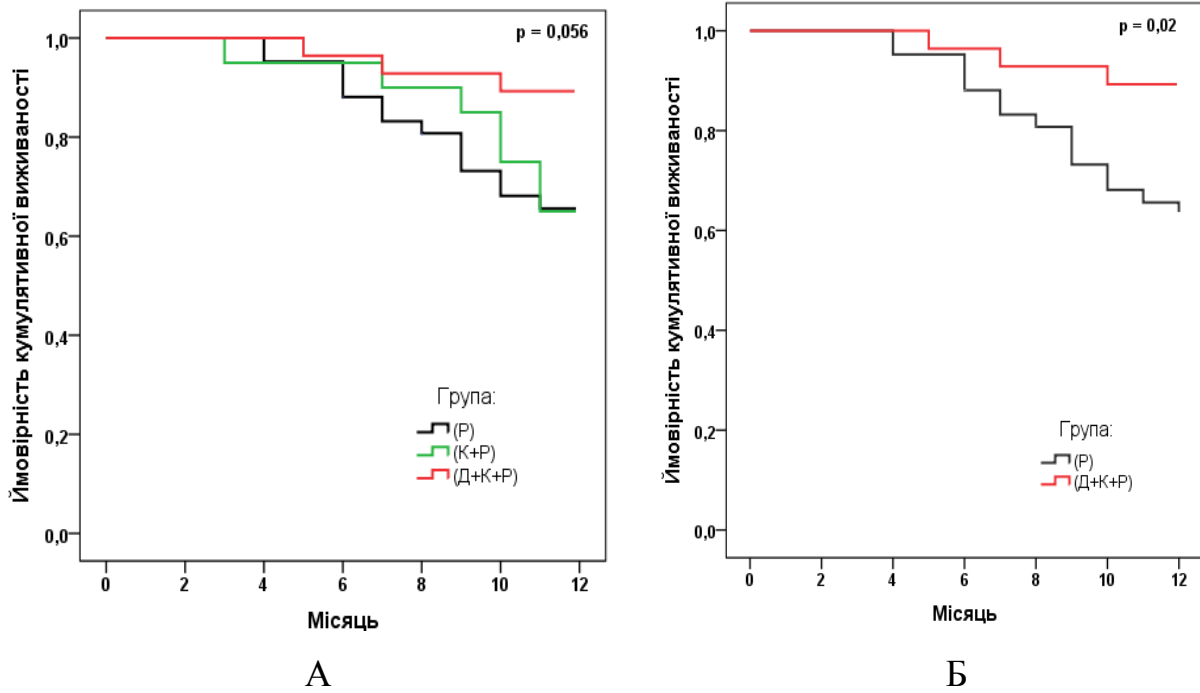


Рис. 7.2. Ймовірність кумулятивної виживаності (Kaplan–Meier) в термін спостереження 12 міс.: А – між групами хворих на НЗПЗ (P), (K+P) та (D+K+P); Б – між групою порівняння хворих на НЗПЗ (P) та основною групою (D+K+P).

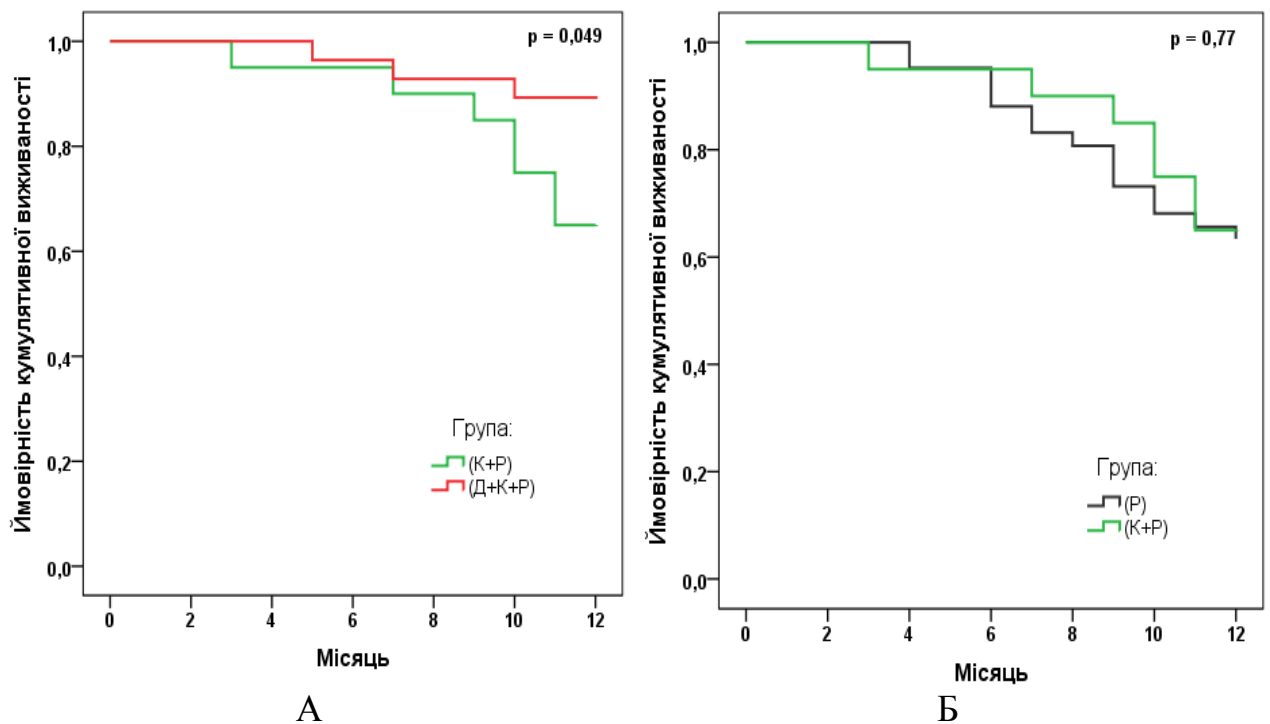


Рис. 7.3. Ймовірність кумулятивної виживаності (Kaplan–Meier) в термін спостереження 12 міс.: А – між групою порівняння хворих на НЗПЗ (K+P) та основною групою (D+K+P); Б – між групами порівняння хворих на НЗПЗ (P) та (K+P).

Аналогічним чином було побудовано функції кумулятивної виживаності в термін спостереження 18 місяців для груп порівняння (Р), (К+Р) та основної групи (Д+К+Р), що представлено на рисунку 7.4А. В термін спостереження 18 міс. кумулятивна виживаність в групі порівняння (Р) склала 42,2 %, групі порівняння (К+Р) – 49,5 %, основній групі (Д+К+Р) – 74,7 %. В основній групі (Д+К+Р) ймовірність виживаності хворих в термін спостереження 18 міс. достовірно на 32,5 % перевищував відповідний показник в групі порівняння (Р) та на 25,2 % – в групі порівняння (К+Р) на рівні значущості ($\chi^2=7,35$; $p=0,025$). При проведенні порівняння по показнику кумулятивної виживаності в термін спостереження 1,5 роки між групами порівняння (Р) та (К+Р) достовірної різниці виявлено не було ($\chi^2=0,20$; $p=0,65$). При цьому кумулятивна виживаність в групі (К+Р) лише на 7,3 % перевищувала відповідний показник в групі (Р), що представлено на рисунку 7.4Б.

При порівнянні групи порівняння (Р) з основною групою (Д+К+Р) показник кумулятивної виживаності для яких складав 42,2 та 74,7 % відповідно, в термін спостереження 18 міс. виявлено достовірну різницю на рівні значущості ($\chi^2=7,17$; $p=0,007$), що представлено на рисунку 7.5А. При порівнянні групи порівняння (К+Р) з основною групою (Д+К+Р) показник кумулятивної виживаності для яких складав 49,5 та 74,7 % відповідно, в термін спостереження 18 міс. виявлено достовірну різницю на рівні значущості ($\chi^2=4,08$; $p=0,043$), що представлено на рисунку 7.5Б.

Максимальний термін спостереження, при якому ми могли дослідити наявність або відсутність достовірної різниці по показнику кумулятивної виживаності між всіма трьома групами хворих (Р), (К+Р) та (Д+К+Р) становив 2 роки. Це було обумовлено тим, що набір пацієнтів в групу (Д+К+Р) проводився з 2016 по 2017 рік включно.

Ймовірність кумулятивної виживаності (Kaplan-Meier) між групами хворих на НЗПЗ (Р), (К+Р) та (Д+К+Р) в термін спостереження 24 міс. представлено на рисунку 7.6А.

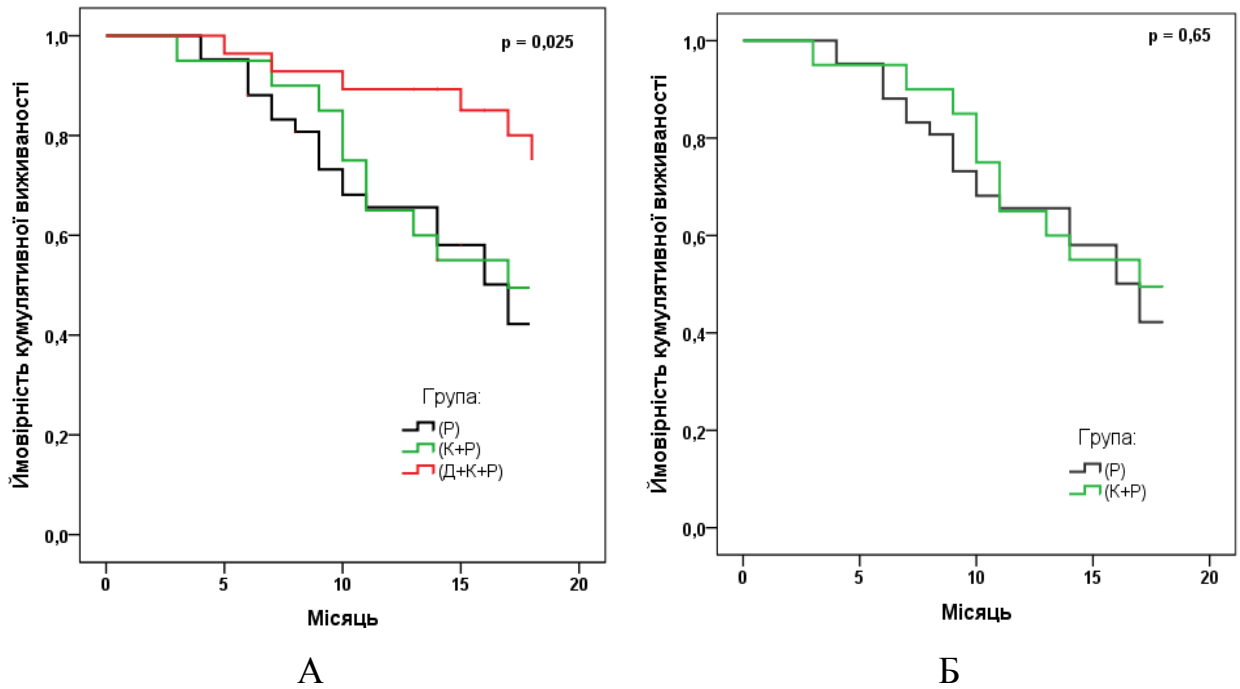


Рис. 7.4. Ймовірність кумулятивної виживаності (Kaplan–Meier) в термін спостереження 18 міс.: А – між групами хворих на НЗПЗ (Р), (К+Р) та (Д+К+Р); Б – між групою порівняння хворих на НЗПЗ (Р) та групою порівняння (К+Р).

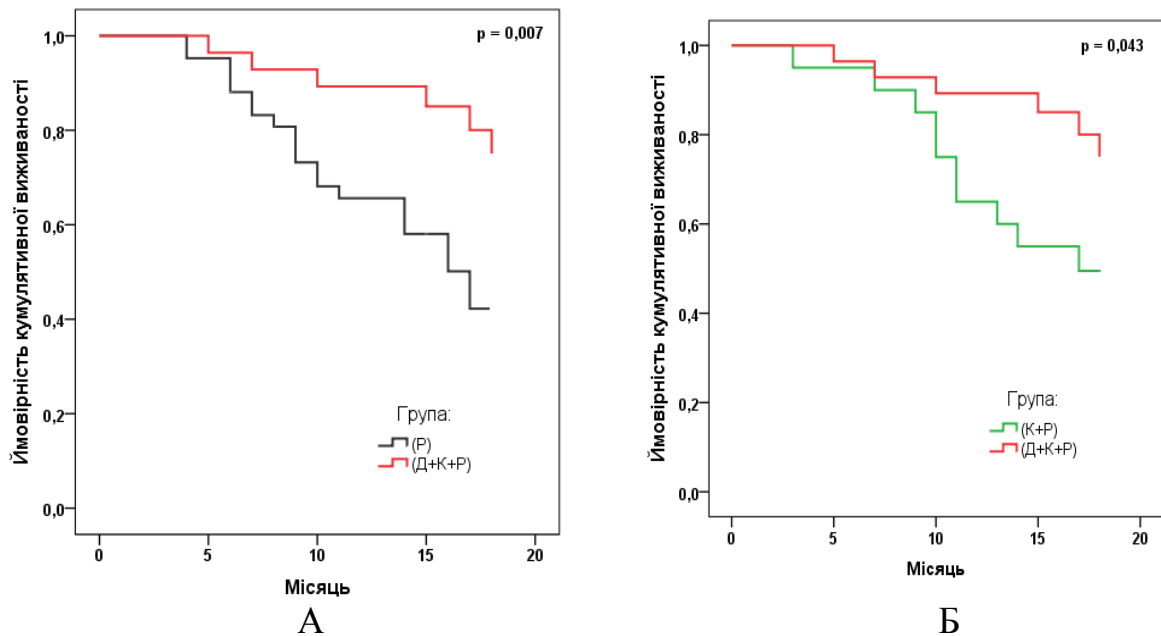


Рис. 7.5. Ймовірність кумулятивної виживаності (Kaplan–Meier) в термін спостереження 18 міс.: А – між групою порівняння хворих на НЗПЗ (Р) та основною групою (Д+К+Р); Б – між групою порівняння хворих на НЗПЗ (К+Р) та основною групою (Д+К+Р).

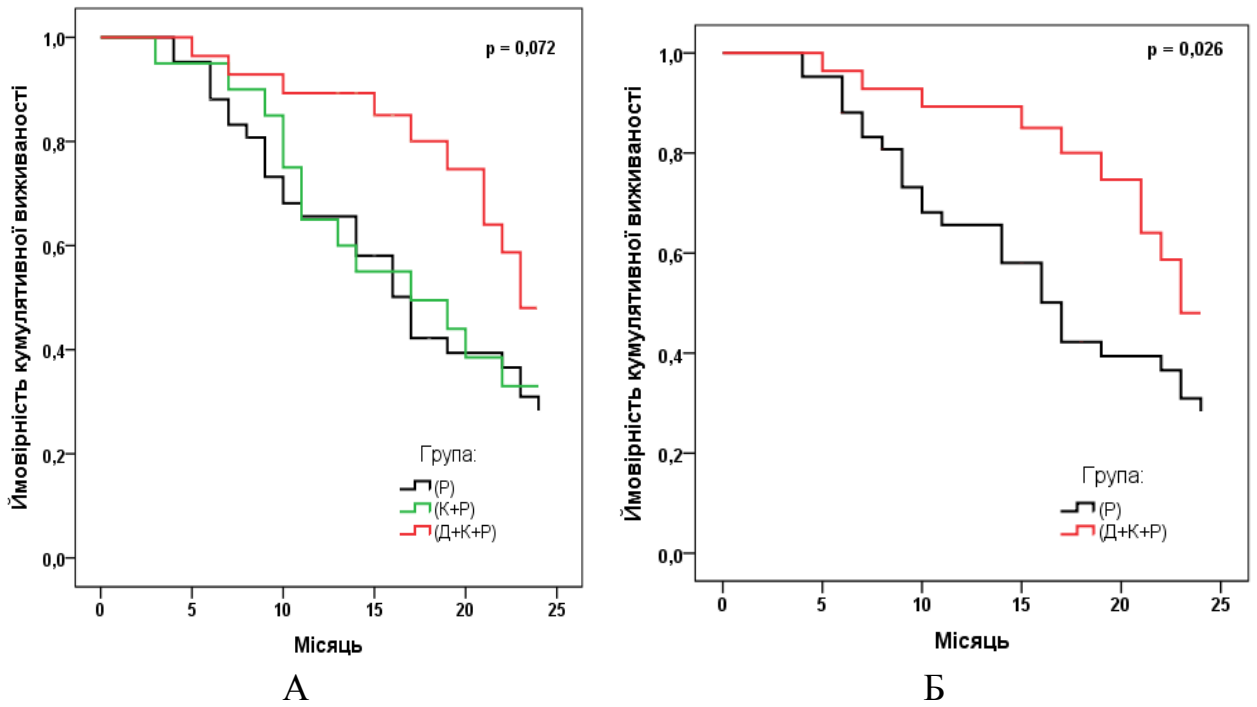


Рис. 7.6. Ймовірність кумулятивної виживаності (Kaplan–Meier) в термін спостереження 24 міс.: А – між групами хворих на НЗПЗ (Р), (К+Р) та (Д+К+Р); Б – між групою порівняння хворих на НЗПЗ (Р) та основною групою (Д+К+Р).

В групі порівняння (Р) кумулятивна виживаність склала 28,1 %, групі порівняння (К+Р) – 33,0 %, основній групі (Д+К+Р) – 48,0 % ($\chi^2=5,25$; $p=0,072$). При порівнянні групи порівняння (Р) з основною групою (Д+К+Р) показник кумулятивної виживаності для яких складав 28,1 та 48,0 % відповідно, в термін спостереження 24 міс. виявлено достовірну різницю на рівні значущості ($\chi^2=4,96$; $p=0,026$) (рис. 7.6Б). При цьому в основній групі (Д+К+Р) кумулятивна виживаність на 19,9 % була вищою ніж в групі порівняння (Р).

При порівнянні групи порівняння (К+Р) з основною групою (Д+К+Р) показник кумулятивної виживаності для яких складав 33,0 та 48,0 % відповідно, в термін спостереження 24 міс. достовірної різниці виявлено не було ($\chi^2=3,0$; $p=0,083$), що представлено на рисунку 7.7А. При цьому в основній групі (Д+К+Р) кумулятивна виживаність на 15,0 % була вищою ніж в групі порівняння (К+Р). При проведенні порівняння по показнику кумулятивної виживаності в термін спостереження 2 роки між групами порівняння (Р) та (К+Р) достовірної різниці виявлено не було ($\chi^2=0,10$; $p=0,74$).

При цьому кумулятивна виживаність в групі (К+Р) лише на 4,9 % перевищувала відповідний показник в групі (Р) (рис. 7.7Б).

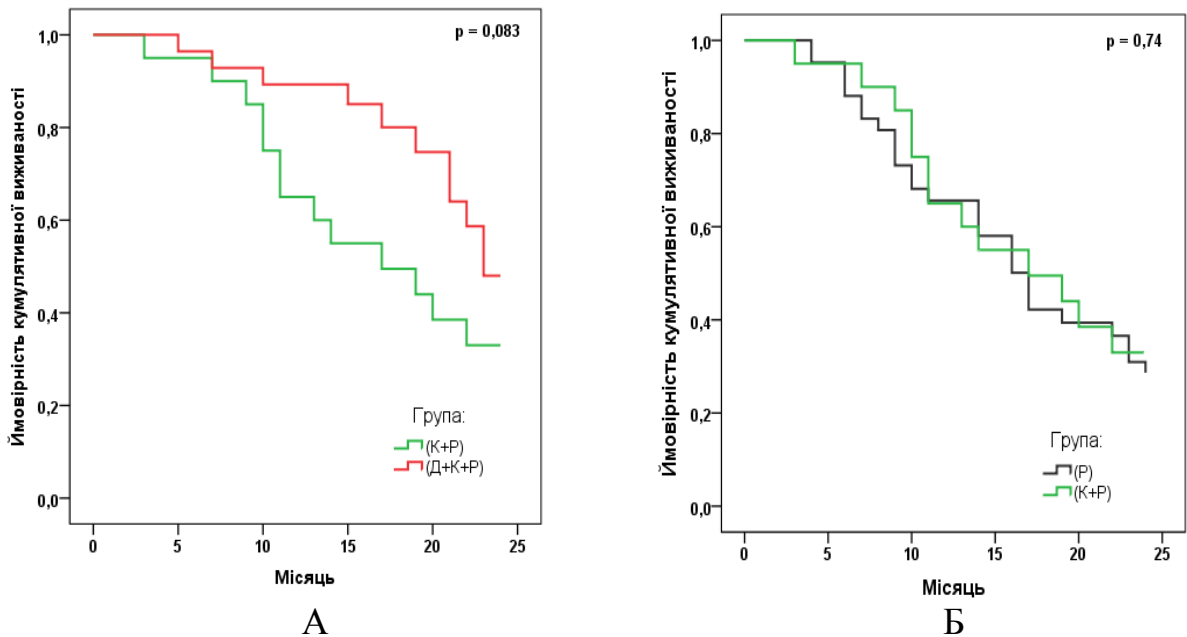


Рис. 7.7. Ймовірність кумулятивної виживаності (Kaplan–Meier) в термін спостереження 24 міс.: А – між групою порівняння хворих на НЗПЗ (К+Р) та основною групою (Д+К+Р); Б – між групою порівняння хворих на НЗПЗ (Р) та (К+Р).

Трирічну кумулятивну виживаність ми могли дослідити лише в групі порівняння (Р) та (К+Р), так як включення пацієнтів на НЗПЗ в групу (К+Р) було завершено в 2015 році (рис. 7.8).

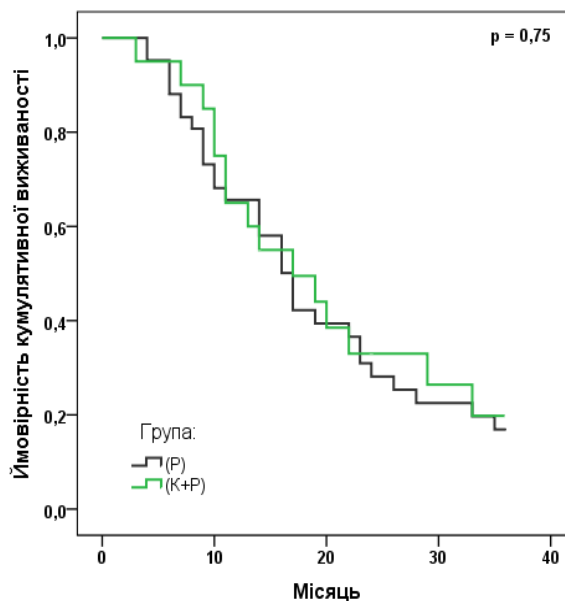


Рис. 7.8. Ймовірність кумулятивної виживаності (Kaplan–Meier) між групою порівняння хворих на НЗПЗ (Р) та (К+Р) в термін спостереження 36 міс.

Показник кумулятивної виживаності в термін спостереження 3 роки для групи порівняння (Р) становив 16,9 %, а в групі порівняння (К+Р) – 19,8 %. Кумулятивна виживаність в групі (К+Р) не достовірно була вищою ніж відповідний показник в групі (Р) на 2,9 % ($\chi^2=0,10$; $p=0,75$).

В групі порівняння (Р) станом на червень 2018 року 5-річна виживаність була прослідкована у 29 хворих. Показник 5-річної виживаності в групі склав 10,3 %, так як лише 3 з 29 хворих залишаються живими станом на червень 2018 року. Одна хвора живе 92 міс. після ПДР, на 89 місяці в неї було діагностовано рак яєчників, канцероматоз очеревини та метастаз аденокарциноми ПЗ в ліву долю печінки. Ще одна хвора залишається під наглядом 74 місяці після ДР ПЗ, на 72-му місяці виявлено локальний рецидив. У одного хворого станом на червень 2018 р. після ПДР спостереження складає 73 міс. і дані про прогресію відсутні.

Висновок

Оптимізація методу кріофіксації, шляхом розробки та впровадження в клінічну практику нового, ефективного способу кріопотенціювання, що полягає в попередньому введенні в солідну злоякісну резектабельну пухлину ПЗ дистильованої H_2O за 5 хв до початку локальної кріодії кріоаплікатором \varnothing 30 мм з набору універсальної кріохірургічної установки «Кріо-Пульс» подвійним циклом зі спонтанним періодом відтавання після кожного періоду заморозки дозволив достовірно збільшити кумулятивну виживаність хворих на НЗПЗ в основній групі (Д+К+Р) в термін спостереження 18 міс. на 32,5 %, що перевищував відповідний показник в групі порівняння (Р) та на 25,2 % – в групі порівняння (К+Р) на рівні значущості ($\chi^2=7,35$; $p=0,025$).

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дисертаційній роботі представлено результати експериментально-клінічного дослідження, в процесі проведення якого було вирішено ряд нових наукових завдань, що дозволило досягти поставленої мети – достовірно покращити віддалені результати хірургічного лікування хворих з незапальними захворюваннями підшлункової залози шляхом удосконалення методу кріофіксації без погіршення безпосередніх результатів лікування.

Нами вперше було запропоновано визначення терміну кріофіксація. Кріофіксація – це кріохірургічний метод локального низькотемпературного впливу на резектабельну пухлину, перед її мобілізацією та видаленням з метою зменшення ризику інтраопераційної дисемінації пухлинних клітин, обумовленої хірургічною травмою неоплазми, за рахунок посилення антибластичного ефекту шляхом девіталізації пухлинних клітин, абластичного ефекту за рахунок «виключення» регіонарного пухлинного кровотоку [15].

З метою проведення експериментальної та клінічної частини дослідження нами було вперше розроблено універсальний комплекс вимірювальний інтраопераційний термопарний чотириканальний (КВІТ-4), для реєстрації показників температури на дискретних глибинах (3, 8, 13 та 18 мм) від робочої поверхні кріоаплікатора з набору універсальної кріохірургічної установки «Кріо-Пульс» (Україна) в біологічній тканині у фіксованих точках під час процесу локальної кріодії в експерименті, та – кріофіксації в клініці (патент України на корисну модель № 116730 від 2017 р.). Розроблений вимірювальний комплекс дозволив нам однаково ефективно реєструвати показники температур в режимі реального часу на дискретних глибинах в біологічній тканині, як на експериментальних моделях *in vivo*, *in vitro*, так і в резектабельній солідній злоякісній пухлині підшлункової залози (ПЗ) клінічної частини дослідження.

Метою експериментального дослідження була розробка ефективного методу потенціювання локальної кріодії на солідну злоякісну пухлину. Дослідження виконувались на базі Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології (ІЕПОР) імені Р. Є. Кавецького НАН України (м. Київ) в червні – серпні 2016 р. у чотири етапи.

Завданням першого етапу було визначення динаміки змін температури на дискретних глибинах, розмірів (висота, діаметр) та об'єму льодяної кулі (*ice-ball*) у гіпотонічному (дистильована H_2O), фізіологічному (0,9 % NaCl) та насиченому гіпертонічному (36 % NaCl) розчині під час локальної кріодії.

За результатами першого етапу дослідження встановлено: при локальній кріодії кріоаплікатором \varnothing 20 мм з часом експозиції періоду заморожування 10 хв, найбільший об'єм льоду утворюється в дистильованій H_2O і складає в середньому $(21,8 \pm 0,9)$ $см^3$, що на 71,6 % перевищує об'єм сегмента льодяної кулі в розчині 0,9 % NaCl та на 384,4 % – в розчині 36 % NaCl, для яких об'єми льоду склали $(12,7 \pm 0,3)$ $см^3$ та $(4,2 \pm 0,3)$ $см^3$ відповідно; в дистильованій H_2O в кінці 10-ї хв локальної кріодії аплікатором \varnothing 20 мм досягаються середні температури в діапазоні мінусових значень по усіх чотирьох термопарах, що достовірно перевищують відповідні значення середніх температур як у розчині 0,9 % NaCl, так і 36 % NaCl на рівні значущості $p < 0,001$; на підставі отриманих результатів першого етапу експериментального дослідження було висунуто гіпотезу, що дистильована H_2O може бути використана в якості ефективного засобу потенціювання локальної кріодії в біологічній тканині, внаслідок притаманних їй специфічних теплофізичних властивостей, а саме – холодопроведення та кристалоутворення; завданням другого етапу експериментального дослідження було вивчення морфологічних змін у пухлинних клітинах при контакті їх суспензії з дистильованою H_2O та отримання відповіді щодо необхідної мінімальної тривалості часу експозиції, достатньої для розвитку максимальної їх гідратації за рахунок осмосу. В якості експериментальної моделі обрано карциному Герена.

За результатами другого етапу експериментального дослідження було встановлено: час експозиції тривалістю 5 хв є достатнім при контакті пухлинних клітин (ПК) карциноми Герена з дистильованою H_2O для розвитку максимальної їх гідратації за рахунок осмосу; середня площа поперечного січення ПК групи порівняння препаратів складала $(17,3 \pm 0,1)$ μm^2 , що достовірно менше, ніж в дослідній групі препаратів $(59,7 \pm 0,5)$ μm^2 з часом експозиції в дистильованій H_2O – 5 хв на рівні значущості $p < 0,05$; середній розмір клітин карциноми Герена, що перебували в контакті з дистильованою H_2O , починаючи з 5-ї хвилини експозиції збільшується не менш ніж у 3,4 рази порівняно з групою порівняння; в 100 % клітин карциноми Герена, починаючи з 5-ї хв їх контакту з дистильованою H_2O , відмічаються необоротні морфологічні зміни з різним ступенем деструкції, що ведуть до неминучої клітинної загибелі. Зі збільшенням часу експозиції контакту пухлинних клітин з дистильованою H_2O до 10 та 15 хв дані деструктивні зміни продовжують тільки прогресувати.

Отримані нами результати першого та другого етапу експериментального дослідження дали підстави для припущення, що введення дистильованої H_2O в біологічну тканину, у т. ч. пухлинну, за 5 хв до початку локальної кріодії може посилювати (потенціювати) процес кріодеструкції за рахунок ефекту гідратації клітин унаслідок їх осмотичного набряку. Як відомо, одним з механізмів загибелі клітин біологічної тканини під час локальної кріодії є пошкодження їх мембрани інтрацелюлярними кристалами льоду. Вода в цитоплазмі клітини – це джерело формування кристалів льоду, що на етапі спонтанного відтавання продовжують зростати та пошкоджують структури клітини.

Метою третього етапу експериментального дослідження було отримання відповіді на запитання, чи посилює процес локальної кріодії попереднє введення дистильованої H_2O в біологічну тканину за відсутності кровотоку.

Для досягнення поставленої мети: вивчали динаміку змін температури на дискретних глибинах у фіксованих точках біологічної тканини під час локальної кріодії подвійним циклом без застосування та із застосуванням попереднього введення в тканину дистильованої H_2O ; досліджували морфологічні зміни, які відбуваються в тканині печінки свині, після локальної кріодії подвійним циклом та через 5 хв після введення дистильованої H_2O з наступним проведенням локальної кріодії подвійним циклом.

В якості експериментальної моделі було обрано паренхіматозний орган – печінку свині. Було сформовано дві групи дослідних зразків печінки: групу порівняння (ГП) та основну (ОГ). В кожну групу включено по 3 дослідних зразки. Середня маса печінки складала ($1553 \pm 65,3$) г. Локальну кріодію без додаткових маніпуляцій проводили в ГП; в ОГ – попередньо вводили 20 мл дистильованої H_2O в паренхіму печінки, в ділянці запланованої локальної кріодії, через 5 хв після введення проводили локальний кріовплив. Динаміку змін температури в печінці на дискретних глибинах (3, 8, 13 та 18 мм) від робочої поверхні кріоаплікатора визначали за допомогою комплексу вимірювального термопарного чотириканального (КВІТ-4). Застосовували кріоаплікатор з діаметром робочої поверхні 20 мм та температурою $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$, час експозиції кріовпливу складав 10 хв. Кріодеструкцію виконували подвійним циклом з наступним спонтанним відтаванням після завершення 10-ї хв кріовпливу кожного циклу заморозки як в поєднанні з кріопотенціюванням дистильованою H_2O , так і без.

Щодо вихідного значення температури печінки свині, яка становила в обох групах $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ було встановлено, що в ОГ на глибині 3 мм від робочої поверхні кріоаплікатора в кінці 10-ї хв другого циклу кріовпливу середня температура на 97,2 % нижча, ніж в ГП; на глибині 8 мм – на 142,1 % нижча, ніж в ГП; на глибині 13 мм – на 152,7 % нижча ніж в ГП; на глибині 18 мм – на 109 % нижча ніж в ГП.

Таким чином, було встановлено, що в ОГ, де за 5 хв до початку локального кріовпливу в паренхіму печінки свині вводили дистильовану H_2O , в кінці 10-ї хв як першого, так і другого циклів кріовпливу на всіх глибинах (3, 8, 13 та 18 мм) отримано достовірно нижчі середні значення температур, ніж в ГП (дистильовану H_2O не вводили) на рівні значущості у всіх випадках $p < 0,001$.

Вище наведене диктує необхідність дослідження ефектів локальної дії при введенні в солідну пухлину дистильованої H_2O на експериментальній моделі *in vivo* за збереженого кровотоку.

Метою четвертого етапу експериментального дослідження було отримання відповіді на запитання, чи посилює попереднє введення дистильованої H_2O в солідну пухлину процес локальної кріодії за збереженого кровотоку.

Для досягнення поставленої мети вирішували наступні завдання: вивчити динаміку змін температури на дискретних глибинах у фіксованих точках в пухлинній тканині під час локальної кріодії подвійним циклом без застосування та із застосуванням попереднього введення в тканину дистильованої H_2O ; розробити формулу розрахунку об'єму дистильованої H_2O , яку необхідно ввести в солідну пухлину з метою кріопотенціювання; дослідити морфологічні зміни, які відбуваються в пухлинній тканині після двох циклів локальної кріодії без потенціювання дистильованою H_2O та з кріопотенціюванням.

В якості експериментальної моделі було обрано карциному Герена, перещеплену білим безпородним щурам. Було використано 40 білих безпородних щурів-самок масою 110–140 г, взятих з акредитованого віварію ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка. До моменту формування дослідних груп з дослідження було загалом виключено 22,5 % ($n=9$) дослідних тварин. Причини виключення: негативне перещеплення ($n=3$); висота пухлини до 12-ї доби від моменту перещеплення менше 20 мм ($n=4$); ріст пухлини химерної форми та місце її

локалізації, відмінне від запланованого, що унеможливило стандартизований підхід до проведення локального кріовпливу з термометрією ($n=2$). Отже, із 40 щурів, яким виконувалось перещеплення карциноми Герена, відсоток позитивних перещеплень склав 92,5 % ($n=37$). Із 37 дослідних тварин, у яких було констатовано позитивний ефект перещеплення, у 89,2 % випадків ($n=31$) висота пухлини до 12-ї доби після перещеплення мала розмір більше 20 мм.

Таким чином було сформовано 2 групи дослідних тварин: ГП – 6 щурів з перещепленою карциномою Герена без будь-якого впливу на пухлину; ОГ – 25 щурів.

ОГ було розподілено на 3 підгрупи: підгрупа А – 7 щурів, у пухлину яких вводили лише дистильовану H_2O ; підгрупа Б – 8 щурів, де проводилась локальна кріодія на пухлину подвійним циклом; підгрупа С – 10 щурів: в пухлину карциноми Герена вводили дистильовану H_2O та через 5 хв проводили 2 цикли локальної кріодії.

Середній об'єм пухлини ($V_{п.}$, $см^3$) дослідних тварин ($n=17$) підгрупи А та С становив $10,54\text{ см}^3$ (95 % ВІ: 9,86 – 11,21). Середній об'єм дистильованої H_2O ($V_{д.в.}$, $мл^3$), введеної в пухлину склав $4,0\text{ мл}^3$ (95 % ВІ: 3,7 – 4,2). При порівнянні середніх значень $V_{п.}$ та $V_{д.в.}$ виявлено достовірну різницю на рівні значущості $p < 0,001$.

У відсотковому співвідношенні в експерименті на моделі карциноми Герена білих безпородних щурів максимальний середній $V_{д.в.}$, що був введений в солідну пухлину, склав 38 % від $V_{п.}$. Таким чином, нами було виведено коефіцієнт (К), який становить 3,8. Останній ми застосували у формулі розрахунку об'єму дистильованої H_2O , необхідної для введення в солідну пухлину з метою потенціювання процесу локальної кріодії (кріофіксації, кріодеструкції).

Отже, з метою введення в солідну пухлину дистильованої H_2O , необхідний її об'єм можна розраховувати за наступною розробленою формулою 8.1:

$$V_{д.в.} = V_{п.} \times 0,38, \quad (8.1)$$

де $V_{д.в.}$ – об'єм дистильованої H_2O (мл³);

$V_{п.}$ – об'єм пухлини (см³);

0,38 – коефіцієнт (К), що визначений експериментально.

Застосовували кріоаплікатор діаметром 20 мм та температурою робочої поверхні -180 °С, час експозиції кріодії складав 5 хв. Кріодеструкцію виконували подвійним циклом з наступним спонтанним відтаванням після завершення 5-ї хв кріодії кожного циклу заморозки як у поєднанні з кріопотенціюванням дистильованою H_2O , так і без.

За показниками термопар Т3 (13 мм) та Т4 (18 мм) було відмічено, що середня температура з 1-ї та до 5-ї хв включно впродовж періоду заморозки першого циклу локальної кріодії не досягає мінусових значень на відміну від відповідних термограм, де застосовувалось кріопотенціювання дистильованою H_2O .

При порівнянні значень середньої температури в пухлині карциноми Герена на дискретних глибинах (3, 8, 13 та 18 мм) за показниками термопар Т1–Т4 КВІТ-4 під час локальної кріодії, починаючи з 1-ї та до 5-ї хв включно, досягались достовірно нижчі показники температур в підгрупі С (n=10) як під час першого, так і другого періоду заморожування порівняно з підгрупою В (n=8) на рівні значущості $p < 0,001$.

Т.ч., вперше в експерименті, на моделях *in vitro* та *in vivo*, було обґрунтовано ефективність застосування попереднього введення в біологічну тканину дистильованої H_2O з метою потенціювання локальної кріодії:

В основу клінічної частини дослідження було покладено аналіз результатів діагностики, лікування та спостереження за 97 хворими з незапальними захворюваннями підшлункової залози (НЗПЗ), які були проліковані в період з 2010 до 2017 р. в Київському міському центрі хірургії захворювань печінки, жовчних протоків та підшлункової залози імені В. С. Земскова при Київській міській клінічній лікарні №10, що є клінічною

базою кафедри загальної хірургії №1 НМУ імені О. О. Богомольця.

Дослідження було розподілено на 3 етапи: на **1-му етапі** (2010–2015 рр.) хворим з резектабельною солідною пухлиною ПЗ виконували класичний варіант резекції залози, тип якої залежав від локалізації пухлини; на **2-му етапі** (2015–2016 рр.) – проводили кріофіксацію пухлини з наступним виконанням резекції ПЗ, тип якої визначався локалізацією пухлини; на **3-му етапі** (2016–2017 рр.) проводили посилення процесу кріофіксації, шляхом попереднього введення в пухлину дистильованої H_2O з наступним виконанням кріофіксації та резекції ПЗ.

Усіх хворих, включених в дослідження в період з 2010 по 2017 рр., було розподілено на 3 групи – дві групи порівняння та одну основну.

Для зручності сприйняття представлених даних, сформовані групи хворих були позначені наступним чином:

– «Р» – хворі групи порівняння першого періоду дослідження (2010–2015 рр.), яким виконувався той чи інший тип резекції ПЗ за стандартною, загальноприйнятою на той момент часу методикою (n=46);

– «К+Р» – хворі групи порівняння другого періоду дослідження (2015–2016 рр.), яким виконували кріофіксацію пухлини за загальноприйнятою на той момент часу методикою з наступним виконанням резекції ПЗ, тип якої визначався локалізацією пухлини (n=21);

– «Д+К+Р» – основна група хворих третього періоду дослідження (2016–2017 рр.), яким спочатку проводили посилення процесу кріофіксації, шляхом попереднього введення в пухлину дистильованої H_2O з послідуєчим виконанням кріофіксації та резекції ПЗ (n=30).

Групу порівняння (Р), (К+Р) та основну групу (Д+К+Р) в свою чергу було розподілено на дві підгрупи: **підгрупа I** та **підгрупа II**.

Розподіл хворих кожної із сформованих груп на підгрупи був обумовлений локалізацією пухлини: у підгрупу I увійшли хворі з локалізацією пухлини в проксимальному відділі ПЗ (головка); у підгрупу II

– з локалізацією в дистальному відділі залози (тіло, хвіст, межа тіла-хвоста ПЗ).

Група порівняння (Р) складала 47,4 % від загальної кількості хворих, включених в дослідження, група порівняння (К+Р) – 21,6 %, основна група (Д+К+Р) – 31 %.

Із загальної кількості включених в дослідження хворих 97 (100 %): чоловіків 53 (54,6 %), жінок – 44 (45,4 %). Розподіл по групах був наступний: у групі (Р) частка чоловіків складала 23 (50 %), жінок – також 23 (50 %), у групі (К+Р) чоловіків – 13 (61,9 %), а жінок – 8 (38,1 %); у групі (Д+К+Р) частка чоловіків – 17 (56,7 %), жінок 13 (43,3 %). Середній вік всіх хворих, включених у дослідження (n=97), складав $(60,4 \pm 1,1)$ роки (95 % ВІ: 58,3–62,6). В групі (Р) середній вік складав $(58,4 \pm 1,7)$ років (95 % ВІ: 55–61,8), у групі (К+Р) – $(61,6 \pm 2,1)$ років (95 % ВІ: 57,1–66,1); у групі (Д+К+Р) – $(62,7 \pm 1,8)$ років (95 % ВІ: 59–66,5). Згідно з критеріями включення та невключення в дослідження в період 2010–2017 рр. було залучено 72,2 % (70 з 97) пацієнтів з проксимальною локалізацією пухлини (головка ПЗ) та 27,8 % (27 з 97) з локалізацією пухлини в її дистальних відділах (тіло, хвіст, на межі тіла-хвоста). При аналізі даних розподілу хворих за стадією згідно ТТНМ-7 при локалізації солідної пухлини в головці ПЗ суттєвої відмінності не виявлено – стадію ІВ було встановлено в 22,68 % хворих, стадію ІА – в 25,77 % та стадію ІІВ – в 23,71 %. Однак, у дистальному відділі ПЗ виявлено переважання частоти встановлення ІІВ стадії порівняно з ІВ та ІА, у співвідношенні 12,37 %, 6,19 % та 9,28 % відповідно.

Таким чином, в дослідження в період 2010–2017 рр. було включено 97 хворих на РПЗ, середній вік яких склав $(60,4 \pm 1,1)$ роки (95 % ВІ: 58,3–62,6).

Переважають пацієнти з проксимальною локалізацією пухлини ПЗ (головка) 72,2 % (70 з 97); хворі з локалізацією пухлини в дистальних відділах ПЗ (тіло, хвіст, на межі тіла-хвоста) склали 27,8 % (27 з 97). Частка хворих чоловічої статі – 53 (54,6 %) була дещо вища ніж жіночої 44 (45,4 %). Частота встановлення ІА та ІІВ стадії у хворих з резектабельним РПЗ

суттєво не відрізнялась і становила 35 % (34 хворих з 97) та 36,1 % (35 хворих з 97) відповідно. У жодного хворого, включеного в дослідження, не встановлено ІА стадію, а ІВ стадія зустрічалась у 28,9 % випадків.

Статистично значущої різниці частоти розподілу хворих на РПЗ між групами порівняння (Р), (К+Р) та основною групою (Д+К+Р) за віком, статтю, локалізацією пухлини, стадією захворювання по TNM-7 не виявлено, $p > 0,05$. Дослідні групи були репрезентативними, що дозволяло нам проводити в подальшому між ними порівняльний аналіз результатів лікування хворих на НЗПЗ.

На першому етапі клінічної частини дослідження в групі порівняння (Р) було встановлено, що середній $V_{п.}$ за даними магнітно-резонансної панкреатохолангіографії (МРПХГ) складав $(22,4 \pm 2,9) \text{ см}^3$ (95 % ВІ: 16,2–28,5 см^3); $V_{п.}$ за даними мультиспіральної комп'ютерної томографії (МСКТ) – $(21,2 \pm 2,8) \text{ см}^3$ (95 % ВІ: 15,1–27,3); фактичний об'єм видаленої пухлини – $(21,8 \pm 2,3) \text{ см}^3$ (95 % ВІ: 16,9–26,7). Т.ч. $V_{п.}$ за даних МРПХГ та МСКТ достовірно не відрізняється від фактичного об'єму видаленої пухлини на рівні значущості, $p = 0,951$.

Додатково в групі порівняння (Р) визначали циркулюючі пухлинні клітини (ЦПК) в крові, ізольовані пухлинні клітини (ІПК) в перитонеальних змивах та циркулюючу пухлинну ДНК (цпДНК) з KRAS-мутацією з метою визначення можливості їх застосування як додаткового маркера безпосереднього контролю проведеної кріофіксації.

Було проаналізовано 72 цитоблоки, виготовлених із забраних зразків крові від 24 пацієнтів групи (Р). В жодному з цитоблоків ЦПК не були виявлені ані звичайним цитологічним методом, ані при імуногістохімічному забарвленні. У жодного з 22 хворих у зразках перитонеальних змивів, забраних відразу після лапаротомії, не було виявлено ІПК ні при застосуванні звичайного цитологічного методу, ні імуноцитохімічного. У 2 хворих імуноцитохімічним (ІЦХ) методом виявлено ІПК на заключному етапі операції, що склало 9 % від загальної кількості хворих ($n=22$), у яких

визначались ІПК. При аналізі загальної (ЗВ) та безрецидивної виживаності (БВ) не встановлено ніяких тенденцій щодо впливу цих знахідок на прогноз у радикально оперованих хворих. Медіана БВ для групи цих хворих складала 12 міс. В групі порівняння (Р) з 10 хворих, які були включені в дослідження в 2013 р., у 7 (70 %) в матеріалі парафінових блоків формалін-фіксованої пухлинної тканини була виявлена KRAS-мутація. У 57,1 % випадків зустрічався с.35G > А тип KRAS-мутації, с.34G > С (14,3 %), с.35G > Т (14,3 %), с.183А > С (14,3 %). У жодному зразку плазми крові, забраної як до, під час, так і після операції методом цифрової крапельної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), цпДНК не була виявлена. Аналіз причин відсутності виявлення цпДНК вказує на однозначне виключення можливості помилки на етапі забору, зберігання або транспортування зразків замороженої плазми.

Т.ч. за результатами першого етапу клінічної частини дослідження було сформовано наступні висновки:

- частота виявлення ЦПК в крові з центральної вени до лапаротомії, портальної вени – після мобілізації пухлини, центральної вени – перед ушиванням лапаротомної рани у 24 радикально оперованих хворих з резектабельним РПЗ склала 0 %. ЦПК не було виявлено в жодному із 72 дослідних зразків крові як при застосуванні звичайного цитологічного методу, так і при використанні ІЦХ методу діагностики;

- частота виявлення ІПК в перитонеальних змивах з очередини відразу після лапаротомії до маніпуляцій з пухлиною ПЗ у 22 хворих на резектабельний РПЗ склала 0 %. В 9 % (2 з 22 хворих) кластери ІПК були виявлені в перитонеальних змивах імуноцитохімічним методом перед ушиванням лапаротомної рани. Наш досвід показав, що імуноцитохімічний метод дослідження перитонеальних змивів, незважаючи на вищу його чутливість і специфічність порівняно з рутинним цитологічним дослідженням, на сучасному етапі не може бути використаний для оцінки інтраопераційної перитонеальної дисемінації раку підшлункової залози (РПЗ)

та прогнозу виживаності радикально-оперованих хворих на РПЗ. Наявність ППК аденокарциноми ПЗ в перитонеальних змивах не є протипоказом до радикальної операції в потенційно резектабельних випадках. Довгострокову виживаність можна очікувати у хворих на резектабельний РПЗ, навіть за наявності ППК в перитонеальних змивах, у разі адекватного мультимодального підходу в лікуванні;

- цитологічний та імуноцитохімічний методи виявлення ЦПК в крові та ППК в перитонеальних змивах не може бути рекомендований на сьогодні, як додатковий «інструмент» контролю ефективності проведення кріофіксації солідної злоякісної пухлини ПЗ, через вкрай низьку інформативність;

- метод цифрової крапельної ПЛР для кількісного визначення цпДНК у хворих з резектабельним РПЗ з KRAS-мутацією на сьогодні не можна використовувати як рутинний метод контролю ефективності лікування, в т. ч. для визначення ефективності кріофіксації солідних злоякісних резектабельних пухлин ПЗ.

У 2015 р. було проведено 2-й етап клінічного дослідження. Метод попередньої кріофіксації резектабельної солідної злоякісної пухлини при хірургічному лікуванні НЗПЗ був застосований у 21 хворого, які увійшли в групу порівняння (К+Р).

Метою 2-го етапу дослідження було: визначити температурний градієнт кріофіксації пухлини у фіксованих точках на різній глибині від поверхні кріоаплікатора; визначити морфологічні зміни фіксованих точок у пухлині, що піддавалась кріофіксації, та встановити кореляційний зв'язок між цими змінами та температурним градієнтом.

Пацієнтам групи порівняння(К+Р) спочатку проводили кріофіксацію пухлини з наступним виконанням резекції ПЗ за стандартною методикою. Хворі групи (К+Р) склали 19,8 % від загальної кількості (n=97), включених у дослідження в період 2010–2017 рр.

Середній вік хворих групи (К+Р) складав ($61,6 \pm 2,1$) роки (95 % ВІ: 57,1–66,1 років). Жінок було 8, чоловіків – 13, що склало 38,1 та 61,9 %

відповідно. Частота локалізації пухлин у проксимальному відділі ПЗ переважала її частоту в дистальних відділах залози. Так, у головці ПЗ солідна резектабельна пухлина локалізувалась у 14 (66,7 %) хворих, у хвості – 1 (4,8 %), у тілі – в 4 (19 %), на межі тіла-хвоста ПЗ в 2 (9,5 %).

Встановлено лінійний кореляційний зв'язок ($R = -0,980$; $p = 0,020$) між рівнем досягнутої середньої температури в пухлинній тканині ПЗ і відсотком ПК, що загинули внаслідок первинного кріопошкодження.

За результатами другого етапу клінічної частини дослідження було сформульовано наступні висновки:

- у хворих з локалізацією резектабельної солідної пухлини в тілі і хвості ПЗ при кріофіксації досягаються статистично значущо більш низькі середні температури на глибині 3, 8, 13 і 18 мм порівняно з хворими, у яких пухлина локалізується в головці ПЗ, що обумовлено масивним теплоприведенням від магістральних судин у проекції головки залози;

- відсоток пухлинних клітин з необоротними деструктивними змінами зменшується із збільшенням відстані від робочої поверхні кріоаплікатора і корелює з досягнутою критичною температурою на конкретній глибині;

- тромбоз судин мікроциркуляторного русла в пухлинній тканині має місце в тих її ділянках, де було досягнуто температури нижче 0 °С. В пограничних із сегментом льодяної кулі ділянках пухлинної тканини, де температура вище 0 °С, переважає внутрішньосудинний сладж;

- кріофіксація резектабельної солідної пухлини ПЗ подвійним циклом кріоаплікатором діаметром 30 мм з тривалістю експозиції періоду заморозки 10 хв зі спонтанним відтаванням не гарантує 100 % необоротної деструкції ПК за рахунок первинного кріопошкодження на глибині 3, 8, 13 та 18 мм від робочої поверхні кріоаплікатора.

У 2016–2017 рр. було проведено 3-й етап клінічної частини дослідження. Хворим на НЗПЗ основної групи (Д+К+Р) в солідну резектабельну пухлину за 5 хв до початку проведення кріофіксації вводили

дистильовану H_2O з метою кріопотенціювання з наступним виконанням класичного варіанта резекції ПЗ залежно від локалізації пухлини в проксимальному чи дистальному її відділах. Метод потенціювання дистильованою H_2O процесу кріофіксації резектабельної солідної злоякісної пухлини при хірургічному лікуванні НЗПЗ був застосований у 30 хворих, які увійшли в основну групу (Д+К+Р).

При розробці методу потенціювання кріофіксації НЗПЗ нами було прийнято рішення вдосконалити відомий спосіб посилення локальної кріодії на пухлину ПЗ шляхом повторенням циклів «заморожування-відтавання» (патент України на корисну модель № 119932 від 2017 р.).

Впроваджений спосіб кріопотенціювання шляхом попереднього введення в резектабельну злоякісну солідну пухлину головки ПЗ дистильованої H_2O дозволяє досягати під час кріофіксації температур в діапазоні мінусових значень на всіх дослідних глибинах (3, 8, 13, 18 мм), що у відсотковому співвідношенні на $(111,4 \pm 20,1) \%$ нижчі в підгрупі (Д+К+Р)_I порівняно з підгрупою (К+Р)_I. При цьому значення $t_{\text{сер.}}$ в підгрупі (Д+К+Р)_I основної групи достовірно нижчі порівняно з підгрупою (К+Р)_I групи порівняння на рівні значущості $p < 0,05$ по всіх дослідних глибинах (3, 8, 13, 18 мм).

Введення дистильованої H_2O в резектабельну злоякісну солідну пухлину головки ПЗ за 5 хв до початку локальної кріодії (підгрупа Д+К+Р)_I дозволяє в кінці 10-ї хв другого циклу кріофіксації досягати температури в діапазоні мінусових значень, що в середньому в $(2,1 \pm 0,2)$ рази перевищує значення температур, де кріопотенціювання не застосовували (підгрупа К+Р)_I).

Порівняльний аналіз значень досягнутої середньої температури в пухлині ПЗ за показниками термопар Т1–Т4 КВІТ-4 в кінці 10-ї хвилини другого циклу кріофіксації було проведено між підгрупою (К+Р)_{II} групи порівняння та підгрупою (Д+К+Р)_{II} основної групи хворих. Було встановлено, що попереднє введення дистильованої H_2O в резектабельну злоякісну солідну

пухлину дистального відділу ПЗ дозволяє досягати під час кріофіксації температур у діапазоні мінусових значень також на всіх дослідних глибинах (3, 8, 13, 18 мм), що у відсотковому співвідношенні на $(91,1 \pm 22,3) \%$ нижчі в підгрупі (Д+К+Р)_{II} порівняно з підгрупою (К+Р)_{II}. При цьому значення $t_{\text{сер.}}$ в підгрупі (Д+К+Р)_{II} основної групи достовірно нижчі в порівняно з підгрупою (К+Р)_I групи порівняння на рівні значущості $p < 0,05$ по всіх дослідних глибинах (3, 8, 13, 18 мм).

Введення дистильованої H_2O в резектабельну зляжкісну солідну пухлину дистального відділу ПЗ за 5 хв до початку локальної кріодії (підгрупа (Д+К+Р)_{II}) дозволяє вкінці 10-ї хв другого циклу кріофіксації досягати температур в діапазоні мінусових значень, що в середньому в $(1,85 \pm 0,24)$ рази перевищує значення температур, де кріопотенціювання не застосовувалось (підгрупа К+Р_{II}).

Т.ч. за результатами третього етапу клінічної частини дослідження було сформульовано наступні висновки:

- введення в резектабельну солідну зляжкісну пухлину ПЗ дистильованої H_2O за 5 хв до початку процесу кріофіксації чинить потенціуючий ефект, що проявляється досягненням більш низьких температур за показниками термопар Т1–Т4 КВІТ-4, у т. ч. в найбільш віддалених від робочої поверхні кріоаплікатора ділянках;

- при локалізації пухлини в проксимальному відділі ПЗ потенціювання процесу кріофіксації дистильованою H_2O дозволяє отримувати середні температури в діапазоні мінусових значень в кінці 10-ї хв другого циклу заморозки, що в $(2,1 \pm 0,2)$ рази перевищують значення температур, де кріопотенціювання не застосовували;

- при локалізації пухлини в дистальному відділі ПЗ потенціювання процесу кріофіксації дистильованою H_2O дозволяє отримувати середні температури в діапазоні мінусових значень вкінці 10-ї хв другого циклу заморозки, що в $(1,85 \pm 0,24)$ рази перевищують значення температур, де кріопотенціювання не застосовували;

– кріофіксація резектабельної солідної злоякісної пухлини ПЗ, потенційована попереднім введенням в неї дистильованої H_2O , із застосуванням кріоаплікатора \varnothing 30 мм та проведенням подвійного циклу заморозки з часом експозиції одного циклу 10 хв та наступним спонтанним відтаванням після кожного циклу, дозволяє гарантовано отримувати необоротні деструктивні зміни у 100 % пухлинних клітин унаслідок ефекту первинного кріопошкодження, а також мікротромбозів у судинах мікроциркуляторного русла пухлини у всіх ділянках її об'єму.

Ефективність розробленого способу потенціювання кріофіксації резектабельної солідної пухлини ПЗ оцінювали шляхом порівняльного аналізу безпосередніх та віддалених результатів лікування між групами порівняння (Р), (К+Р) та основною групою (Д+К+Р).

Нами було проведено кількісний аналіз безпосередніх результатів лікування хворих з НЗПЗ у вигляді порівняння між групою порівняння (Р), групою порівняння (К+Р) та основною групою (Д+К+Р).

Безпосередні ранні післяопераційні результати лікування оцінювали за наступними показниками: тривалість оперативного втручання (хв); об'єм інтраопераційної крововтрати (мл); чи проводилась гемотрансфузія під час операції та її об'єм; тривалість перебування хворого в реанімації після операції (доба); доба, на яку з'явилась активна перистальтика; частота та характер післяопераційних ускладнень; частота та причини релапаротомії (повторне оперативне втручання протягом 30 днів після первинної операції); кількість післяопераційних ліжко-днів; післяопераційна летальність.

Достовірної різниці між групами за вище наведеними показниками виявлено не було, окрім дня появи активної перистальтики, що з'являлась на 1-у добу пізніше в групі порівняння (К+Р) та основній групі (Д+К+Р) порівняно з групою порівняння (Р) і складала $(4 \pm 0,3)$, $(4 \pm 0,25)$ та $(3 \pm 0,2)$ відповідно на рівні значущості $p < 0,001$.

Враховуючи особливості дизайну дослідження, а саме його етапність, що передбачала послідовний набір хворих в групу порівняння (Р) в період з

2010 по 2015 рр., групу порівняння (К+Р) в період з 2015 по 2016 р. та основну групу (Д+К+Р) в період з 2016 по 2017 р. включно – аналіз віддалених результатів лікування між всіма групами проводився в терміни спостереження 12, 18 та 24 місяці.

Враховуючи те, що загалом по всій вибірці хворих на НЗПЗ (n=97), що були включені в дослідження в період з 2010 по 2017 рр. показник післяопераційної летальності склав 7,2 %, то віддалені результати лікування були відстежені в 90 з 97 хворих.

Ймовірність кумулятивної виживаності (Kaplan-Meier) між групами хворих на НЗПЗ (Р), (К+Р) та (Д+К+Р) в термін спостереження 12 міс. склала 63,1 %, 65 % та 89,3 % відповідно.

Не дивлячись на те, що в основній групі (Д+К+Р), ймовірність виживаності хворих в термін спостереження 12 міс на 26,2 % перевищувала відповідний показник в групі порівняння (Р) та на 24,3 % в групі порівняння (К+Р) достовірної різниці між трьома групами не було виявлено ($\chi^2=5,75$; $p=0,056$).

В термін спостереження 18 міс. кумулятивна виживаність в групі порівняння (Р) склала 42,2 %, групі порівняння (К+Р) – 49,5 %, основній групі (Д+К+Р) – 74,7 %. В основній групі (Д+К+Р) ймовірність виживаності хворих в термін спостереження 18 міс. достовірно на 32,5 % перевищував відповідний показник в групі порівняння (Р) та на 25,2 % – в групі порівняння (К+Р) на рівні значущості ($\chi^2=7,35$; $p=0,025$).

При проведенні порівняння по показнику кумулятивної виживаності в термін спостереження 1,5 роки між групами порівняння (Р) та (К+Р) достовірної різниці виявлено не було ($\chi^2=0,20$; $p=0,65$). При цьому кумулятивна виживаність в групі (К+Р) лише на 7,3 % перевищувала відповідний показник в групі (Р).

Максимальний термін спостереження, при якому ми могли дослідити наявність або відсутність достовірної різниці по показнику кумулятивної виживаності між всіма трьома групами хворих (Р), (К+Р) та (Д+К+Р)

становив 2 роки. Це було обумовлено тим, що набір пацієнтів в групу (Д+К+Р) проводився з 2016 по 2017 рік включно. В групі порівняння (Р) кумулятивна виживаність в термін спостереження 24 міс. склала 28,1 %, групі порівняння (К+Р) – 33,0 %, основній групі (Д+К+Р) – 48,0 % ($\chi^2=5,25$; $p=0,072$).

Показник кумулятивної виживаності в термін спостереження 3 роки для групи порівняння (Р) становив 16,9 %, а в групі порівняння (К+Р) – 19,8 %. Кумулятивна виживаність в групі (К+Р) не достовірно була вищою ніж відповідний показник в групі (Р) на 2,9 % ($\chi^2=0,10$; $p=0,75$).

Трирічну кумулятивну виживаність ми могли дослідити лише в групі порівняння (Р) та (К+Р), так як включення пацієнтів на НЗПЗ в групу (К+Р) було завершено в 2015 році.

В групі порівняння (Р) станом на червень 2018 року 5-річна виживаність була прослідкована у 29 хворих. Показник 5-річної виживаності в групі склав 10,3 %, так як лише 3 з 29 хворих залишаються живими станом на червень 2018 року.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено результати експериментально-клінічного дослідження, в процесі проведення якого було вирішено ряд нових наукових завдань, що дозволило досягти поставленої мети – достовірно покращити віддалені результати хірургічного лікування хворих з незапальними захворюваннями підшлункової залози шляхом удосконалення методу кріофіксації.

1. Завдяки розробленому способу контролю показників температури на дискретних глибинах шляхом застосування мідь-константанових термопар Т-типу довжиною 3, 8, 13 та 18 мм встановлено, що у хворих з локалізацією резектабельної солідної пухлини в тілі і хвості підшлункової залози при кріофіксації подвійним циклом кріоаплікатором діаметром 30 мм з тривалістю експозиції періоду заморозки 10 хв зі спонтанним відтаванням досягаються достовірно нижчі показники середньої температури на глибині 3, 8, 13 і 18 мм порівняно з хворими, у яких пухлина локалізується в головці підшлункової залози, що обумовлено масивним теплоприведенням від магістральних судин у проекції головки залози.

2. Кріофіксація резектабельної солідної пухлини підшлункової залози подвійним циклом кріоаплікатором діаметром 30 мм з тривалістю експозиції періоду заморозки 10 хв зі спонтанним відтаванням не гарантує 100 % необоротної деструкції пухлинних клітин за рахунок первинного кріопошкодження на дослідних глибинах від робочої поверхні кріоаплікатора. Відсоток пухлинних клітин з необоротними деструктивними змінами зменшується із збільшенням відстані від робочої поверхні кріоаплікатора і корелює ($R = -0,980$; $p = 0,020$) з досягнутою критичною температурою на конкретній глибині. Тромбоз судин мікроциркуляторного русла в пухлинній тканині має місце в тих її ділянках, де досягається температура нижче $0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3. Цитологічний, імуноцитохімічний метод в ідентифікації циркулюючих пухлинних клітин в крові та ізольованих пухлинних клітин у перитонеальних змивах, метод полімеразної ланцюгової реакції в

ідентифікації циркулюючої пухлинної дезоксирибонуклеїнової кислоти з KRAS-мутацією у плазмі крові хворих на резектабельний рак підшлункової залози – не є діагностично значимими та інформативними для рекомендації їх рутинного застосування в клінічній практиці, як додаткового засобу безпосереднього контролю ефективності проведення кріофіксації.

4. Методика потенціювання процесу кріофіксації дистильованою H_2O резектабельної солідної злоякісної пухлини підшлункової залози дозволяє отримати середні температури в діапазоні мінусових значень в кінці 10-ї хв другого циклу заморозки, які в $(2,1 \pm 0,2)$ рази перевищують значення температур, де кріопотенціювання не застосовували – при локалізації пухлини в проксимальному відділі підшлункової залози, та в $(1,85 \pm 0,24)$ рази – при локалізації пухлини в дистальному відділі підшлункової залози.

5. Потенціювання процесу кріофіксації резектабельної солідної пухлини підшлункової залози шляхом попереднього введення в останню дистильованої H_2O , об'єм якої складає 38 % об'єму пухлини та послідуєчим виконанням двох циклів локальної кріодії аплікатором \varnothing 30 мм з набору універсальної кріохірургічної установки «Кріо-Пульс» дозволяє досягати гарантовано середніх температур на всіх дослідних глибинах (3, 8, 13 та 18 мм) в діапазоні мінусових значень, що викликають 100 % необоротну деструкцію пухлинних клітин в заданому об'ємі за рахунок ефекту первинного кріоушкодження та тромбоз судин мікроциркуляторного русла пухлини.

6. Метод потенціювання дистильованою H_2O процесу кріофіксації резектабельної солідної злоякісної пухлини підшлункової залози подвійним циклом заморожування з послідуєчим виконанням радикальної резекції залози дозволив достовірно збільшити кумулятивну виживаність хворих в основній групі (Д+К+Р) в термін спостереження 18 міс. до 74,7 %, що перевищував відповідний показник в групі порівняння (Р) на 32,5 %, та на 25,2 % – в групі порівняння (К+Р) на рівні значущості ($\chi^2=7,35$; $p=0,025$).

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. З метою профілактики інтраопераційної дисемінації пухлинних клітин внаслідок пальпаторно-тракційних маніпуляцій з пухлиною на етапі мобілізації комплексу, у хворих з резектабельною протоковою аденокарциномною підшлункової залози першим етапом операції показано виконання кріофіксації пухлини.

2. Показанням до застосування методу кріофіксації є резектабельна злоякісна солідна пухлина підшлункової залози з локалізацією в головці, тілі, хвості або на межі тіла-хвоста залози IB, ПА та ПВ стадії за TNM 7-го перегляду.

3. Об'єм пухлини ($V_{п.}$) підшлункової залози розраховується за формулою $[V_{п.} = (a \times b \times c) \times 0,52]$, де a – ширина, b – висота, c – довжина; при визначенні лінійних розмірів пухлини (ширина, висота, довжина) метод мультиспіральної комп'ютерної томографії не має переваг над методом магнітно-резонансної холангіопанкреатографії, тому будь-який з них може застосовуватись однаково ефективно.

4. Дані $V_{п.}$, отримані на доопераційному етапі, необхідні для розрахунку об'єму дистильованої H_2O ($V_{д.в.}$), що необхідно вводити в пухлину з метою кріопотенціювання за формулою $[V_{д.в.} = V_{п.} \times 0,38]$, де $V_{д.в.}$ – об'єм дистильованої H_2O (мл³); $V_{п.}$ – об'єм пухлини (см³); 0,38 – коефіцієнт (K), що визначений експериментально.

5. Через 5 хв після введення в пухлину підшлункової залози розрахованого за формулою об'єму дистильованої H_2O , на передній її поверхні необхідно встановити кріоаплікатор Ø 30 мм та провести два послідовні цикли кріофіксації універсальною кріохірургічною установкою «Кріо-Пульс» (період заморозки кожного циклу тривалістю 10 хв, період відтавання – спонтанний). Після завершення другого циклу кріофіксації пухлини виконуються класичні етапи операції в залежності від локалізації пухлини в проксимальному чи дистальному відділі залози.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бондар Г. В., Бідний В. Г., Жарков Я. В. Основи кріохірургії. Київ: Прінт-Експрес, 2005. 175 с.
2. Брацлавский И. Ф., Керемет Л. С., Красников А. Р. А.с. 1229593 СССР, МПК G 01 K 1/00. Устройство для измерения температуры преимущественно для медико-биологических объектов. Физико-технический институт низких температур АН УССР и Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР (SU). № 3800443/24-10; заявлено 12.10.84; опубліковано 07.05.86. Бюл. 17.
3. Васильев А. В. Криодеструкция опухолей челюстно-лицевой локализации и пути повышения ее эффективности (клинико-экспериментальное исследование): автореф. дис. ... к.мед.н.: 14.00.21. Ленинград, 1979. – 18 с.
4. Васильев С. А., Песня-Прасолов С. Б. Применение криохирургического метода в нейрохирургии. Нейрохирургия. 2009. № 4. С. 63–70.
5. Винник Ю. А., Котенко А. Е., Чибисов Л. П. Интраоперационное криовоздействие в лечении рака прямой кишки. Пробл. криобиологии. 1999. № 3. С. 72–76.
6. Волов М. Б. Применение криохирургического метода при открытых оперативных вмешательствах у больных опухолями головного мозга : дис. ... канд. мед. наук : 14.00.28. Санкт-Петербург, 2007. 201 с.
7. Данилов М. В., Федоров В. Д. Хирургия поджелудочной железы : руководство [для врачей]. М.: Медицина, 1995. 512 с.
8. Дегтев М. В., Кожевников Е. В., Кожевников В. А. Способ криодеструкции бородавок и гемангиом с использованием этамзилата натрия. Вестник дерматологии и венерологии. 2011. № 1. С. 69–72.
9. Державна фармакопея України: в 3 т. 2-ге вид. Харків: ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. Т. 2. 724 с.

10. Дронов А. И., Ковальская И. А., Земсков С. В., Крючина Е. А. Влияние несостоятельности панкреатоеюноанастомоза на выживаемость пациентов с раком головки поджелудочной железы после панкреатодуоденальной резекции. Хирургия. Восточная Европа. 2016. № 3. С. 366–371.

11. Дронов О. И., Земсков С. В., Хоменко Д. И. Власний досвід визначення ізольованих пухлинних клітин в перитонеальних змивах хворих на рак підшлункової залози. Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П. Л. Шупика. 2014. Кн. 23. Ч. 1. С. 192–197.

12. Дронов О. И., Крючина Е. А., Добуш Р. Д. Лікування раку підшлункової залози. Шпитальна хірургія. 2012. № 1. С. 58–61.

13. Дронов О.И., Хоменко Д. И., Козачук Е. С. Потенціювання локальної кріодії дистильованою Н₂О на моделі безпородних щурів з перевитою карциномою Герена за умов збереженого кровотоку (in vivo). Експерим. і клін. медицина. 2018. № 1 (78). С. 9–19.

14. Дронов А. И., Ковальская И. А., Хоменко Д. И., Земсков С. В. Клиническое значение и собственный опыт выявления циркулирующей опухолевой дезоксирибонуклеиновой кислоты у пациентов с протоковой аденокарциномой поджелудочной железы. Хирургия. Восточная Европа. 2017. № 1. С. 36–42.

15. Дронов А. И., Земсков С. В., Бакунец П. П., Козачук Е. С., Хоменко Д. И. Криоабляционные технологии в комплексном лечении пациентов со злокачественной опухолью поджелудочной железы. Хирургия. Восточная Европа. 2017. № 3. С. 411–422.

16. Дронов А. И., Хоменко Д. И., Земсков С. В., Бакунец П. П., Козачук Е. С. Криофиксация резектабельной протоковой аденокарциномы поджелудочной железы. Хірургія України. 2017. № 4 (64). С. 27–34.

17. Дронов А. И., Бакунец П. П., Земсков С. В., Хоменко Д. И., Козачук Е. С. Метод криодеструкции в лечении больных с опухолью

поджелудочной железы. Актуальные проблемы гепатопанкреатобилиарной хирургии: материалы XXIV Междунар. Конгресса Ассоциации гепатопанкреатобилиарных хирургов стран СНГ, 19–22 сентября 2017, Санкт-Петербург. СПб., 2017. С. 158.

18. Дронов О. І., Хоменко Д. І., Лещенко В. М., Жарков А. Я., Крутько О. А., Земсков С. В., Козачук Є. С. Патент на корисну модель №116730 Україна, МПК А61В 18/02 А61В 17/32. Комплекс вимірювальний інтраопераційний термопарний чотиріканальний (КВІТ-4); власник Дронов О. І., Хоменко Д. І., Лещенко В. М., Жарков А. Я., Крутько О. А., Земсков С. В., Козачук Є. С. № у 201603076; заявлено 25.03.2016; опубліковано 12.06.2017; Бюл. 11.

19. Дронов О. І., Хоменко Д. І. Патент на корисну модель №119932, Україна, МПК А61В 17/00 А61В 18/02. Спосіб посилення процесу криофіксації резектабельної злоякісної солідної пухлини підшлункової залози дистильованою Н₂О. власник Дронов О. І., Хоменко Д. І. № у 201705020; заявлено 24.05.2017; опубліковано 10.10.2017; Бюл. 19.

20. Дронов О. І., Крючина Є. А., Хоменко Д. І., Горлач А. І., Любенко Д. І., Добуш Р. Д., Козачук Є. С. Профілактика дисемінації клітин злоякісних пухлин підшлункової залози. Хірургія України. 2013. № 1. С. 92–99.

21. Дронов О. І., Хоменко Д. І., Бакунець П. П., Тетеріна В. В. Температурні показники після криовпливу, потенційованого дистильованою водою, на експериментальній моделі печінки свині за умов відсутності спланхнічного кровотоку. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2017. № 27(4). С. 348–355.

22. Дронов А.И., Ковальская И. А., Хоменко Д. И., Жарков А. Я., Лещенко В.М., Крутько О.А., Козачук Е. С. Термометрия процесса локального криовоздействия в биологической ткани на дискретных глубинах: разработка комплекса измерительного интраоперационного термопарного четырех-канального (КИИТ-4). Хирургия. Восточная Европа. 2018. Т. 7. № 1. С. 102–110.

23. Есьман С. С., Рикберг А. Б., Бакай Э. А. Поиск *in vitro* оптимальных для криодеструкции параметров ультразвука. Проблемы криобиологии. 1998. С. 22–26.

24. Жолобов Н. И. Исследование и разработка методов и средств реализации управляемого локального криовоздействия на биологические ткани : автореф. дис. ... д-ра техн. наук: 05.11.17 «Медицинские приборы и измерительные системы». М., 1994. 39 с.

25. Захарычев В. Д., Ганусевич И. И. Влияние интраоперационной криодеструкции опухоли на циркулирующие опухолевые клетки и продолжительность жизни больных раком легкого. Онкология. 2011. Т. 13. № 3. С. 243–246.

26. Ионкин Д. А., Степанова Ю. А., Шуракова А. Б., Чжао А. В. Технические особенности и результаты применения криодеструкции при раке поджелудочной железы. Клин. практика. 2016. № 13. С. 24–35.

27. Кандель Э. И. Криохирurgia. М.: Медицина, 1974. 303 с.

28. Киндзельский Л. П., Ананенко В. П., Рикберг А. Б. Использование радиоизотопного теста для оценки нарушений микроциркуляции при различных условиях криовоздействия. Тезисы респ. науч. конф. Киев: Здоров'я, 1976. С. 85–86.

29. Кнейпш С. Мое водолечение: средства для излечения болезней и сохранения здоровья. Київ: Типографія Петра Барського, Крещатикъ, 1898. 352 с.

30. Ковалев А. А., Грудинская Т. В., Кузнецова Т. П., Ковалев К. А. Гетерогенность циркулирующих опухолевых клеток. Онкология. 2012. Т. 14, № 2. С. 126–129.

31. Копчак В. М., Хом'як И. В., Копчак К. В. Новые хирургические технологии в лечении злокачественных опухолей поджелудочной железы и периапулярной зоны. Український журнал хірургії. 2011. № 5. С. 76–82.

32. Коченов В. И. А.с. 1053821 СССР, МПК А 61 В 17/36. Устройство для измерения температурного поля в ткани во время криовоздействия. (SU).

№ 3258720/28-13; заявлено 04.03.81; опубліковано 15.11.83. Бюл. 42.

33. Кубышкин В. А., Ионкин Д. А., Кунгурцев С. В., Чжао А. В. История криохирургии. Хирургия. Журн. им. Н. И. Пирогова. 2015. № 5. С. 62–74.

34. Литвиненко А. А. Криохирургические методы лечения заболеваний опухолевого генеза органов гепатопанкреатодуоденальной зоны (экспериментально-клиническое исследование): дис. ... д-ра мед. наук: 14.01.03. Институт клинической и экспериментальной хирургии АМН Украины. Киев, 1996. 365 с.

35. Литвиненко О. М. Діагностика та хірургічне лікування раку тіла та хвоста підшлункової залози: дис. ... канд. мед. наук. Київ, 1992.

36. Лядов К. В., Егиев В. Н., Лядов В. К., Буланова Е. А. Бесконтактная ("NoTouch") мобилизация опухоли при панкреатодуоденальной резекции: технические аспекты. Анналы хирургической гепатологии. 2011. Т. 16, № 4. С. 77–82.

37. Лях Ю. Е., Гурьянов В. Г., Хоменко В. Н. Основы компьютерной биостатистики. Анализ информации в биологии, медицине и фармации статистическим пакетом MedStat. Донецк: Папакица Е.К., 2006. 214 с.

38. Можаяев С. В., Волов М. Б., Аничков А. Д. Криохирургическое воздействие при лечении опухолей головного мозга. Нейрохирургия. 2008. № 1. С. 13–17.

39. Патютко Ю. И., Котельников А. Г. Хирургия рака органов билиопанкреатодуоденальной зоны: руководство для врачей. М.: Медицина, 2007. 448 с.

40. Патютко Ю. И., Тупицын Н. Н., Сагайдак И. В. Влияние циркуляции опухолевых клеток в крови на прогноз при операциях на печени по поводу злокачественных опухолей. Хирургия. Журн. им. Н. И. Пирогова. 2011. № 6. С. 22–26.

41. Песня-Прасолов С. Б. Криодеструкция опухолей головного мозга под контролем интраоперационной сонографии : дис. ... канд. мед. наук :

14.01.18. М., 2016. 125 с.

42. Пирогов Н. И. Собрание сочинений: в 8-ми томах. Т. 5. Начала общей военно-полевой хирургии. Ч. 1. Севастопольские письма. М. : Медгиз, 1961. С. 88.

43. Про державну метрологічну атестацію комплексу вимірювального інтраопераційного термопарного КВІТ-4 № 01 : свідоцтво № 22.440.12 від 31 грудня 2015 р. ДП «Укрметртестстандарт»; виробник ТОВ НВФ «Пульс»; належить Національному медичному університету імені О. О. Богомольця. – Свідоцтво про уповноваження № ПК 001-2014 від 24 лютого 2014 р.

44. Пушкарь Н. С., Сандомирский Б. П. Теоретические и практические вопросы криохирургии. Криобиология и криомедицина. 1982. № 10. С. 47–58.

45. Самедов В. Х., Захарычев В. Д., Мосин О. А. Криохирургия с локальной СВЧ-гипертермией в лечении больных раком слизистой оболочки полости рта. Клиническая онкология. 2013. № 2 (10). С. 98–100.

46. Сусак Я. М. Діагностика та лікування незапальних захворювань підшлункової залози, ускладнених жовтяницею : автореф. дис. ... д-ра мед. наук, спец. : 14.01.03. К., 2004. 35 с.

47. Сипливий В. А., Евтушенко Д. В., Петренко Г. Д., Шадрин О. В., Робак В. И. Эффективность малоинвазивных эндоскопических вмешательств в лечении обструктивной желтухи доброкачественного генеза. Харківська хірургічна школа. 2015. № 5 (74). С. 26–28.

48. Трушина В. А. Влияние различных температурно-временных режимов криовоздействия на опухоли в эксперименте : дис. ... канд. мед. наук : 14.00.14. Киев, 1984. 167 с.

49. Тычко Р.А., Опарина Н. Ю., Зиновьева О. Л. Количественная оценка изменения уровня экспрессии гена YB-1 при немелкоклеточном раке лёгкого. Труды МФТИ. 2009. Т. 1. № 1. С. 111–119.

50. Федоренко З. П., Гулак Л. О., Михайлович Ю. Й. Рак в Україні, 2015–2016. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної

- служби. Бюлетень Національного канцер-реєстру України. 2017. № 18. 130 с.
51. Фесенко Е. Е., Гахова Э. Н. Действие холода на клетку. Криомедицина. Современные методы: сб. докл. I общерос. науч.-практ. конф. М., 2007.
52. Ханевич М. Д., Манихас Г. М. Криохирургия рака поджелудочной железы. СПб.: Аграф+, 2011. 226 с.
53. Ханевич М. Д., Манихас Г. М., Вашкуров С. М. Использование криовоздействия для повышения эффективности хирургического лечения рака поджелудочной железы (доклад). Заседание общества Пирогова СПбГМУ им. И. П. Павлова № 2373. 2011. Режим доступа: <http://grekovclinic.ru/mdlname=textpage&pageNamePart=2373pirogovmeting>.
54. Хирургическое лечение опухолей печени и поджелудочной железы с использованием криохирургической техники. Под. ред. проф. М. Д. Ханевича. СПб.: Аграф +, 2017. 128 с.
55. Хоменко Д. І., Лук'янова Н. Ю., Козачук Є. С. Результати дослідження процесу локальної кріодії на експериментальних моделях розчинів 36 % NaCl, дистильованої H₂O та 0,9 % NaCl та перспективи їх застосування при проведенні кріофіксації солідних пухлин підшлункової залози. Здобутки клінічної та експериментальної медицини: Підсумкова науково-практична конференція, присвячена 60-річчю Тернопільський державний медичний університет, м. Тернопіль, 14 червня 2017 р.: тези доповіді. Тернопіль, 2017. С. 182–184.
56. 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 H₂O. Інновації в медицині: досягнення молодих вчених: 40-а ювілейна науково-практична конференція молодих вчених Національної медичної академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупика з міжнародною участю, присвячена Дню науки, м. Київ, 18 травня 2017 року: тези доповіді. Київ, 2017. С. 91–93.
57. Цыганов Д. И. Теоретические и экспериментальные основы

создания криохирургической аппаратуры и медицинских технологий ее применения : дис. ... д-ра техн. наук : 05.11.17. М., 1994. 315 с.

58. Чжао А. В., Ионкин Д. А., Вишневский В. А. Лечение рака поджелудочной железы, первичного и метастатического рака печени с применением криохирургии [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.kriohirurgi.ru/specialists/statii/detail.php>.

59. Шалимов, С. А. Рак поджелудочной железы. М. : Книга Плюс, 2007. 320 с.

60. Шафранов В. В., Борхунова Е. Н., Костылев М. А. Механизм разрушения биологических тканей при локальной криодеструкции. Вестн. Российской академии естественных наук. 2012. № 1. С. 68–77.

61. Шафранов В. В., Борхунова Е. Н., Таганов А. В. Концепция первичного повреждения биотканей при локальном криовоздействии. Мед. альманах. 2010. № 2 (11). С. 289–292.

62. Шафранов В. В., Тен Ю. В., Резницкий В. И. СВЧ- и криовоздействие на биоткани в эксперименте и клинике. К.: Наукова думка, 1988. С. 38–42.

63. Шафранов В. В., Борхунова Е. Н., Таганов А. В. Современные технологии лечения больших ангиом критической локализации у детей. Альманах клинической медицины. 2008. № 17 (2). С. 287–288.

64. Anesthesia and Perioperative Care of the High-Risk Patient. 3-th ed. London: I McConachie, 2014. 480 с.

65. Ansari D., Tingstedt B., Andersson B. Pancreatic cancer: yesterday, today and tomorrow. Future Oncol. 2016. Vol. 12. № 16. P. 1929–1946.

66. Arnott J. B. On the treatment of cancer by the regulated application on an anaesthetic temperature. J. Churchill. London, 1851. P. 32–54.

67. Arnott J. B. Practical illustrations of the remedial efficacy of a very low or anaesthetic temperature. Lancet. 1850. Vol. 2. P. 257–259.

68. Ben Eliyahu S., Page G. G., Yirmiya R. Evidence that stress and surgical intervention promote tumor development by suppressing natural killer cell activity.

Int. J. Cancer. 1999. Vol. 80. C. 880–888.

69. Benassai G., Quarto G., Perrotta S. Long-term survival after curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma – Surgical treatment. Int. J. Surgery. 2015. Vol. 21 (suppl. 1). P. S1–S3.

70. Bird H., Arnott J. Aberdeen, 1797–1883, a pioneer in refrigeration. Anaesthesia. 1949. Vol. 4. P. 10–17.

71. Bracco D. The historic development of cryosurgery. Clin. Dermatol. 1990. Vol. 8. P. 1–4.

72. Broll R., Weschta M., Windhoevel U. Prognostic significance of free gastrointestinal tumor cells in peritoneal lavage detected by immunocytochemistry and polymerase chain reaction. Langenbecks Arch. Surg. 2001. Vol. 386. № 4. P. 285–292.

73. Cameron J. L., He J. Two thousand consecutive pancreatoduodenectomies. J. Am. Coll. Surg. 2015. Vol. 220. P. 530–536.

74. Castellanos J. A., Merchant N. B. Intensity of Follow-up after Pancreatic Cancer Resection. Ann. Surg. Oncol. 2014. Vol. 21. № 3. P. 747–751.

75. Chuong M. D., Springett G. M., Freilich J. M. Stereotactic body radiation therapy for locally advanced and borderline resectable pancreatic cancer is effective and well tolerated. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2013. Vol. 86. P. 516–522.

76. Conroy T., Jean-Baptiste Bachet, Ayav A. Current standards and new innovative approaches for treatment of pancreatic cancer. Eur. J. Cancer. 2016. Vol. 57. P. 10–22.

77. 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. P. 259–263.

78. Cooper J. S. Cryogenic surgery for cancer. Fed. Proc. Vol. 2. pt. 3. P. 237–240.

79. Coster H. G. A quantitative analysis of the voltage–current relationships of fixed charge membranes and the associated property of «punch-through». Biophys. J. 1965. Vol. 5. P. 669–686.

80. Delemotte L., Tarek M. Molecular dynamics simulations of lipid membrane electroporation. *J. Membr. Biol.* 2012. Vol. 245. P. 531–543.

81. Dindo D., Demartines N., Clavien P. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Ann. Surg.* 2004. Vol. 240. № 2. P. 205–213.

82. D'Onofrio M., Ciaravino V., De R. Robertis Percutaneous ablation of pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol.* 2016. Vol. 22. № 44. P. 9661–9673.

83. Dronov O. I., Kovalska I. O., Khomenko D. I., Kozachuk Y. S., Bakunets P. P., Zemskov S. Cryofixation of Pancreas Resectable Malignant Solid Tumors. 19th World Congress of International Society of Cryosurgery, Kaunas, Lithuania, September 13–15, 2017: abstract book. Kaunas, 2017. P. 26–28.

84. Dronov O. I., Zemskov S. V., Khomenko D. I. Clinical significance of the isolated tumor cell detection in the peritoneal lavage solution in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. Integrated clinical and pathogenetic approaches in diagnosis and therapy of cancer: International scientific conference, Kyiv, June 13–15, 2016: materials. *Experimental Oncology.* – 2016. Vol. 38. №2. P. 131–132.

85. Dubinsky T. J., Cuevas C., Dighe M. K. High-intensity focused ultrasound: current potential and oncologic applications. *AJR Am. J. Roentgenol.* 2008. Vol. 190. P. 191–199.

86. Ducreux M., Sa Cunha S. A., Caramella C. Cancer of the pancreas: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 2015. Vol. 26 (suppl. 5). P. 56–68.

87. Erinjeri J. P., Clark T. W. Cryoablation: mechanism of action and devices. *J. Vasc. Interv. Radiol.* 2010. Vol. 21 (suppl. 8). P. 187–191.

88. Esposito I., Kleeff J., Bergmann F. Most pancreatic cancer resections are R1 resections. *Ann. Surg. Oncol.* 2008. Vol. 15. P. 1651–1560.

89. Ettrich T. J., Ebert M., Lorenzen S. ASCO- and ESMO-update 2017 - highlights of the 53. meeting of the American Society of Clinical Oncology/ASCO

2017 and European Society for Medical Oncology/ESMO congress 2017. *Z. Gastroenterol.* 2018. Vol. 56. № 4. P. 384–397.

90. Falconi M., Tamburrini D., Buzzetti E., Partelli S. Pancreatic cancer. *Recenti. Prog. Med.* 2016. Vol. 107. № 6. P. 337–340.

91. Fatima J., Schnelldorfer T., Barton J. Pancreatoduodenectomy for ductal adenocarcinoma: implications of positive margin on survival. *Arch. Surg.* 2010. Vol. 145. P. 167–172.

92. Feldman J. P., Goldwasser R., Mark S. A mathematical model for tumor volume evaluation using two-dimensions. *JAQM.* 2009. Vol. 4. № 4. P. 456.

93. Ferrone C. R., Haas B., Tang L. The influence of positive peritoneal cytology on survival in patients with pancreatic adenocarcinoma. *J. Gastrointest. Surg.* 2006. Vol. 10. P. 1347–1353.

94. Frei L., Stieger R. Resectable adenocarcinoma developing in the remnant pancreas 7 years after partial pancreatoduodenectomy for invasive ductal adenocarcinoma of the pancreas: a case report. *J. Med. Case. Rep.* 2017. Vol. 11. P. 194.

95. Gage A. A., Guest K., Montes M. Effect of varying freezing and thawing rates in experimental cryosurgery. *J. Cryobiology.* 1985. Vol. 22. № 2. P. 175–182.

96. Gage A. A., Baust J. Mechanisms of tissue injury in cryosurgery. *Cryobiology.* 1998. Vol. 37. P. 171–186.

97. Gao Y., Zhu Y., Yuan Z. Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA Provide New Insights into Pancreatic Cancer. *Int. J. Med. Sci.* 2016. Vol. 13. № 12. P. 902–913.

98. Gill W., Long W. B. A critical look at cryosurgery. *Int. Surg.* 1971. Vol. 56. P. 344–351.

99. Gill W., Frazer Y., da Costa J. The cryosurgical lesion. *Amer. Surg.* 1970. Vol. 36. P. 437–445.

100. Girelli R., Frigerio I., Giardino A. Results of 100 pancreatic radiofrequency ablations in the context of a multimodal strategy for stage III ductal adenocarcinoma. *Langenbeck's Arch. Surg. Deutsche Gesellschaft für Chirurgie.*

2013. Vol. 398. № 1. P. 63–69.

101. Gottschalk A., Sharma S., Ford J. Review article: the role of the perioperative period in recurrence after cancer surgery. *Anesth. Analg.* 2010. Vol. 110. P. 1636–1643.

102. Goyal K. Stereotactic body radiation therapy for nonresectable tumors of the pancreas. *J. Surg. Res.* 2012. Vol. 174. P. 319–325.

103. He L., Niu L., Korpan N. N. Clinical Practice Guidelines for Cryosurgery of Pancreatic Cancer: A Consensus Statement From the China Cooperative Group of Cryosurgery on Pancreatic Cancer, International Society of Cryosurgery, and Asian Society of Cryosurgery. *Pancreas.* 2017. Vol. 46. № 8. P. 967–972.

104. Hirota M., Shimada S., Yamamoto K. Pancreatectomy using the notouch isolation technique followed by extensive intraoperative peritoneal lavage to prevent cancer cell dissemination. *J. Pancreas (Online).* 2005. Vol. 6. P. 143–151.

105. Hirota M., Shimada S., Yamamoto K. Pancreatectomy using the no-touch isolation technique followed by extensive intraoperative peritoneal lavage to prevent cancer cell dissemination: a pilot study. *JOP.* 2005. Vol. 6. № 2. P. 143–151.

106. Hirota M., Ogawa M. No-touch pancreatectomy for invasive ductal carcinoma of the pancreas. *JOP.* 2014. Vol. 15. № 3. P. 243–249.

107. Hoffmann N. E., Bischof J. C. The cryobiology of cryosurgical injury. *Urology.* 2002. Vol. 60 (suppl. 1). P. 40–49.

108. Irimia D., Karlsson J. O. M. Kinetics of intracellular ice formation in one-dimensional arrays of interacting biological cells. *Biophys. J.* 2005. Vol. 88. P. 647–660.

109. Kandel E. I. *Functional and Stereotactic Neurosurgery.* New York: Springer, 1989. 694 p.

110. Katrina F. C., Dupuy D. E. Thermal ablation of tumours: biological mechanisms and advances in therapy. *Nature Reviews Cancer.* 2014. Vol. 14.

P. 199–208.

111. Kecheng Xu., Korpan N., Lizhi Niu Modern cryosurgery for cancer. World Scientific, 2012. 940 p.

112. Khomenko D., Kosachuk E., Teterina V. Potentiation of local cryoablation process on biological tissue via distilled H₂O. 68th Congress of the Association of Polish Surgeons, Cracow, September 27–30, 2017: abstractbook. Cracow, 2017. P. 504.

113. Kommalapati A., Tella S. H., Goyal G. Contemporary Management of Localized Resectable Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*. 2018. Vol. 10. № 1. P. 24.

114. Korpan N. N. Atlas of Cryosurgery. Vienna: Springer-Verlag Wien, 2001. 528 p.

115. Korpan N. N., Hochwarter G., Sellner F. Cryoscience and cryomedicine: new mechanisms of biological tissue injury following low temperature exposure. Experimental study. *Klin. Khir.* 2009. Vol. 7–8. P. 80–85.

116. Korpan N. N. Cryosurgery: ultrastructural changes in pancreas tissue after low temperature exposure. *Technol. Cancer Res. Treat.* 2007. Vol. 6. № 2. P. 59–67.

117. Kosuga T., Shiozaki A., Ichikawa D. Pleural lavage with distilled water during surgery for esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* 2011. Vol. 26. № 3. P. 577–586.

118. Kovach S. J., Hendrickson R. J., Cappadona C. R. Cryoablation of unresectable pancreatic cancer. *Surgery.* 2002. Vol. 131. P. 463–464.

119. Kudou M., Shiozaki A., Kosuga T. Inhibition of Regulatory Volume Decrease Enhances the Cytocidal Effect of Hypotonic Shock in Hepatocellular Carcinoma. *J. Cancer.* 2016. Vol. 7. № 11. P. 1524–1533.

120. Kuroki T., Eguchi S. No-touch isolation techniques for pancreatic cancer. *Surg. Today.* 2017. Vol. 47. № 1. P. 8–13.

121. Latief M., Dar W. R., Qayoom O. An unusual presentation of pancreatic cancer. *J. Gen. Pract.* 2016. Vol. 4. issue 1. P. 1–3.

122. Lee J. C., Ahn S., Cho I. K. Management of recurrent pancreatic cancer after surgical resection: a protocol for systematic review, evidence mapping and meta-analysis. *BMJ*. 2018. Vol. 8. № 4. P. e017249.

123. Liu K., Ji B., Zang W. Comparison of iodine-125 seed implantation and pancreaticoduodenectomy in the treatment of pancreatic cancer. *Int. J. Med. Sci.* 2014. Vol. 11. № 9. P. 893–896.

124. Lyadov V. K., Milovanov V. V. No-touch pancreatectomy and radical antegrade modular pancreatosplenectomy: a systematic review. *Khirurgiia (Mosk)*. 2016. Vol. 12. P. 93–97.

125. Mahipal A., Frakes J., Hoffe S., Kim R. Management of borderline resectable pancreatic cancer. *World J. Gastrointest. Oncol.* 2015. Vol. 7. № 10. P. 241–249.

126. Malvezzi M., Bertuccio P., Levi F. European cancer mortality predictions for the year 2014. *Ann. Oncol.* 2014. Vol. 25. P. 1650–1656.

127. Malvezzi M., Bertuccio P., Rosso T. European cancer mortality predictions for the year 2015: does lung cancer have the highest death rate in EU women? *Ann. Oncol.* 2015. Vol. 26. № 4. P. 779–786.

128. Mazur P. Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 1984. Vol. 247. P. 125–142.

129. Menahem B., Guittet L., Mulliri A. Pancreaticogastrostomy is superior to pancreaticojejunostomy for prevention of pancreatic fistula after pancreatoduodenectomy: an updated meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann. Surg.* 2015. Vol. 261. P. 882–887.

130. Meszoely I. M., Lee J. S., Watson J. C. Peritoneal cytology in patients with potentially resectable adenocarcinoma of the pancreas. *Am Surg.* 2004. Vol. 70. N 3. P. 208–213.

131. Neeman E., Ben-Eliyahu S. Surgery and stress promote cancer metastasis: new outlooks on perioperative mediating mechanisms and immune involvement. *Brain Behav Immun.* 2013. Vol. 30. P. 32–40.

132. Nomoto S., Nakao A., Kasai Y. Detection of ras gene mutations in

perioperative peripheral blood with pancreatic adenocarcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.* 1996. Vol. 87. P. 793–797.

133. Paiella S., Salvia R., Girelli R. Role of local ablative techniques (Radiofrequency ablation and Irreversible Electroporation) in the treatment of pancreatic cancer. *Updates Surg.* 2016. Vol. 68. № 3. P. 307–311.

134. Papanelopoulou F. Louis Paul Cailletet: The liquefaction of oxygen and the emergence of low-temperature research. *Notes Rec. R. Soc. Lond.* 2013. Vol. 67. № 4. P. 355–373.

135. Pasquali P. *Cryosurgery: A Practical Manual.* Springer, 2015. 315 p.

136. Petrou A., Moris D., Paul Tabet P. Ablation of the locally advanced pancreatic cancer: An introduction and brief summary of techniques. *J. BUON.* 2016. Vol. 21. № 3. P. 650–658.

137. Picozzi V. J., Oh S. Y., Edwards A. Five-Year Actual Overall Survival in Resected Pancreatic Cancer: A Contemporary Single-Institution Experience from a Multidisciplinary Perspective. *Ann. Surg. Oncol.* 2017. Vol. 24. № 6. P. 1722–1730.

138. Polistina F., Constantin G., Casamassima F. Unresectable locally advanced pancreatic cancer: a multimodal treatment using neoadjuvant chemoradiotherapy (gemcitabine plus stereotactic radiosurgery) and subsequent surgical exploration. *Ann. Surg. Oncol.* 2010. Vol. 17. P. 2092–2101.

139. Qiubo Z., Linjuan Z., Yinting C. Pancreatic Cancer Epidemiology, Detection, and Management. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2016. Vol. 2016. P. 8962321.

140. Rahib L., Smith B. D., Aizenberg R. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res.* 2014. Vol. 74. № 11. P. 2913–2921.

141. Riva F., Dronov O. I., Khomenko D. I. Clinical applications of circulating tumor DNA and circulating tumor cells in pancreatic cancer. *Mol. Oncol.* 2016. Vol. 10. № 3. P. 481–493.

142. Rombouts S. J., Vogel J. A., van Santvoort H. C. Systematic review of

innovative ablative therapies for the treatment of locally advanced pancreatic cancer. *Br. J. Surg.* 2015. №102. P. 182–193.

143. Rosenthal M. H., Lee A., Jajoo K., Rosenthal M. H. Imaging and endoscopic approaches to pancreatic cancer. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2015. Vol. 29. № 4. P. 676.

144. Salgado S. M., Gaidhane M., Kahaleh M., Salgado S. M. Endoscopic palliation of malignant biliary strictures. *World J. Gastrointest. Oncol.* 2016. Vol. 8. P. 240–247.

145. Sapi J., Kovacs L., Drexler D. A. Tumor volume estimation and quasi-continuous administration for most effective bevacizumab therapy. *PLoS One.* 2015. Vol. 10. № 11. P. e0142190.

146. Saluja A. K., Dudeja V., Banerjee S. Evolution of novel therapeutic options for pancreatic cancer. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2016. Vol. 32 (issue 5). P. 401–407.

147. Shiozaki A., Ichikawa D., Kosuga T. Regulation of osmolality for cancer treatment. *J. Physiol. Sci.* 2017. Vol. 67. № 3. P. 353–360.

148. Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A. Cancer statistics, 2015. *Cancer J. Clin.* 2015. Vol. 65. P. 5–29.

149. Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A. Cancer statistics, 2017. *Cancer J. Clin.* 2017. Vol. 67. P. 7–30.

150. Simon C. J., Dupuy D. E., Mayo-Smith W. W. Microwave ablation: principles and applications. *Radiographics.* 2005. Vol. 25. P. 69–83.

151. Schellenberg D., Kim J., Christman-Skieller C. Single-fraction stereotactic body radiation therapy and sequential gemcitabine for the treatment of locally advanced pancreatic cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2011. Vol. 81. P. 181–188.

152. Sobin L., Gospodarowicz M. K., Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours.* – 7-th ed. [Электронный ресурс]. Режим доступа. https://www.uicc.org/sites/main/files/private/TNM_Classification.pdf.

153. Steen M. W., van Duijvenbode D. C., Dijk F. Tumor manipulation

during pancreatic resection for pancreatic cancer induces dissemination of tumor cells into the peritoneal cavity: a systematic review. *HPB (Oxford)*. 2018. Vol. 20. № 4. P. 289–296.

154. Steen W., Blom R., Busch O. Prognostic value of occult tumor cells obtained by peritoneal lavage in patients with resectable pancreatic cancer and no ascites: A systematic review. *J. Surg. Oncol.* 2016. Vol. 114. № 6. P. 743–751.

155. Strobel O., Hartwig W., Hackert T. Re-resection for isolated local recurrence of pancreatic cancer is feasible, safe, and associated with encouraging survival. *Ann. Surg. Oncol.* 2013. Vol. 20. № 3. P. 964–972.

156. Takaori K., Bassi C., Biankin A. International Association of Pancreatology (IAP)/European Pancreatic Club (EPC) consensus review of guidelines for the treatment of pancreatic cancer. *Pancreatology*. 2016. Vol. 16. P. 14–27.

157. Takemoto K., Shiozaki A., Ichikawa D. Evaluation of the efficacy of peritoneal lavage with distilled water in colorectal cancer surgery: in vitro and in vivo study. *J. Gastroenterol.* 2015. Vol. 50. № 3. P. 287–297.

158. Tsai S., Erickson B. A., Dua K. Evolution of the Management of Resectable Pancreatic Cancer. *J. Oncol. Pract.* 2016. Vol. 12. № 9. P. 772–778.

159. Turrini O., Ewald J., Barbier L. Should the portal vein be routinely resected during pancreaticoduodenectomy for adenocarcinoma? *Ann. Surg.* 2013. Vol. 257. P. 726–730.

160. Uchikura K., Takao S., Nakajo A. Intraoperative molecular detection of circulating tumor cells by reverse transcription-polymerase chain reaction in patients with biliarypancreatic cancer is associated with hematogenous metastasis. *Ann. Surg. Oncol.* 2002. Vol. 9. P. 364–370.

161. Usatine R. P., Stulberg D. L., Colver G. B. *Cutaneous cruosurgery*. – 4-th ed. CRC Press, 2014. 152 p.

162. Van den Broeck A., Sergeant G., Ectors N. Patterns of recurrence after

curative resection of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Eur. J. Surg. Oncol.* 2009. Vol. 35. № 6. P. 600–604.

163. Verbeke C. S. Resection margins and R1 rates in pancreatic cancer: are we there yet? *Histopathology.* 2008. Vol. 52. P. 787–796.

164. Wai-ki Yiu, Basco M. T., Aruny J. E. Cryosurgery: A review. *Int. J. Angiol.* 2007. Vol. 16, № 1. P. 1–6.

165. Walder H. Experimental cryosurgery. *Int. Cryosurgery.* Springfield, 1968. P. 113–186.

166. Xiao-Mei L., Li-Zhi N., Ji-Bing C., Ke-Cheng X. Advances in cryoablation for pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol.* 2016. Vol. 22. P. 790–800.

167. Xu K., Niu L., Yang D. Cryosurgery for pancreatic cancer. *Gland Surg.* 2013. Vol. 2. P. 30–39.

168. Xu K., Niu L., Mu F., Hu Y. Cryosurgery in combination with brachytherapy of iodine-125 seeds for pancreatic cancer. *Gland. Surg.* 2013. Vol. 2. № 2. P. 91–99.

169. Xu J. Z., Wang W. Q., Zhang S. R. Neoadjuvant Therapy Is Essential for Resectable Pancreatic Cancer. *Curr. Med. Chem.* 2018. Vol. 12. doi: 10.2174/0929867325666180413101722.

170. Yamamoto K., Shimada S., Hirota M. EIPL (extensive intraoperative peritoneal lavage) therapy significantly reduces peritoneal recurrence after pancreatectomy in patients with pancreatic cancer. *JOP.* 2005. Vol. 6. № 2. P. 143–151.

171. Zaporozhchenko B. S., Kachanov V. N., Borodaev I. E. Comparative efficacy of pancreatoduodenal resection using intraoperative cryo-techniques. *Klin. Khir.* 2009. Vol. 10. P. 11–14.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ**Статті у наукових фахових виданнях України:**

1. Дронов О. І., Хоменко Д. І., Козачук Є. С. Потенціювання локальної кріодії дистильованою H_2O на моделі безпородних щурів з перевитою карциномою Герена за умов збереженого кровотоку (*in vivo*). Експериментальна і клінічна медицина. 2018. № 1(78). С. 9–19. *(Здобувачем проведено порівняльний аналіз термограм щурів з перевитою карциномою Герена, обґрунтовано потенціюючий ефект введення дистильованої води в солідну пухлину до початку кріодії, написано статтю).*

2. Дронов О. І., Земсков С. В., Хоменко Д. І. Власний досвід визначення ізольованих пухлинних клітин в перитонеальних змивах хворих на рак підшлункової залози. Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П. Л. Шупика. 2014. Вип. 23. Ч. 1. С. 192–197. *(Здобувачем організовано забезпечення виконання діагностики ізольованих пухлинних клітин в перитонеальних змивах хворих на рак підшлункової залози, безпосередня участь в операціях, написано статтю).*

3. Дронов О. І., Крючина Є. А., Хоменко Д. І., Горлач А. І., Любенко Д. І., Добуш Р. Д., Козачук Є. С. Профілактика дисемінації клітин злоякісних пухлин підшлункової залози. Хірургія України. 2013. № 1. С. 92–99. *(Здобувачем визначено актуальність розробки методів профілактики інтраопераційної дисемінації пухлинних клітин під час радикальних оперативних втручаннях у хворих на рак підшлункової залози, написано статтю).*

Статті у наукових фахових виданнях України,**включених до міжнародних наукометричних баз даних:**

4. 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. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2017. № 27(4). С. 348–355. *(Здобувачем досліджено потенціюючі властивості дистильованої води під час локального кріовпливу на експериментальній моделі печінки свині за умов відсутності спланхнічного кровотоку, написано статтю).*

5. Дронов А. И., **Хоменко Д. И.**, Земсков С. В., Бакунец П. П., Козачук Е. С. Кривофіксація резектабельной протоковой аденокарциномы поджелудочной железы. Хірургія України. 2017. № 4 (64). С. 27–34. *(Здобувачем запропоновано застосування нового методу контролю ефективності процесу кривофіксації резектабельної солідної пухлини підшлункової залози, написано статтю).*

Статті у наукових виданнях інших держав:

6. Дронов А.И., Ковальская И. А., **Хоменко Д. И.**, Жарков А. Я., Лещенко В.М., Крутько О.А., Козачук Е. С. Термометрия процесса локального криовоздействия в биологической ткани на дискретных глубинах: разработка комплекса измерительного интраоперационного терморного четырех-канального (КИИТ-4). Хирургия. Восточная Европа. 2018. Т. 7. № 1. С. 102–110. *(Здобувачем запропоновано застосування розробленого вимірювального комплексу терморного чотирьоканального для інтраопераційної реєстрації показників температури в біологічній тканині на дискретних глибинах, написано статтю).*

7. Дронов А. И., Земсков С.В., Бакунец П. П., Козачук Е. С., **Хоменко Д. И.** Кривоабляционные технологии в комплексном лечении пациентов со злокачественной опухолью поджелудочной железы. Хирургия. Восточная Европа. 2017. Т. 6. № 3. С. 411–422. *(Здобувачем особисто написано фрагмент статті, що пов'язаний із застосуванням методу кривофіксації при радикальному хірургічному лікуванні пацієнтів з незапальними захворюваннями підшлункової залози).*

8. Дронов А. И., Ковальская И. А., **Хоменко Д. И.**, Земсков С. В. Клиническое значение и собственный опыт выявления циркулирующей опухолевой дезоксирибонуклеиновой кислоты у пациентов с протоковой аденокарциномой поджелудочной железы. Хирургия. Восточная Европа. 2017. Т. 6. № 1. С. 36–42. *(Здобувачем проведено діагностику циркулюючої пухлинної ДНК у хворих на резектабельний рак підшлункової залози, написано статтю).*

9. Riva F., Dronov O. I., **Khomenko D. I.**, Huguet F., Louvet C., Mariani P., Stern M.-H., Lantz O., Proudhon C., Pierga J.-Y., Bidard F.-C. Clinical applications of circulating tumor DNA and circulating tumor cells in pancreatic cancer. Molecular Oncology. 2016. Vol. 10. № 3. P. 481–493. *(Здобувачем проведено глибокий аналіз сучасних діагностичних можливостей визначення циркулюючої пухлинної ДНК, циркулюючих пухлинних клітин у хворих на рак підшлункової залози, сформовано висновки).*

Патенти:

10. Дронов О. І., **Хоменко Д. І.**, Лещенко В. М., Жарков А. Я., Крутько О. А., Земсков С. В., Козачук Є. С. Патент на корисну модель №116730 Україна, МПК А61В 18/02 А61В 17/32. Комплекс вимірювальний інтраопераційний термопарний чотириканальний (КВІТ-4); власник Дронов О. І., Хоменко Д. І., Лещенко В. М., Жарков А. Я., Крутько О. А., Земсков С. В., Козачук Є. С. № у 201603076; заявлено 25.03.2016; опубліковано 12.06.2017; Бюл. 11. *(Здобувачем розроблено спосіб контролю показників температури на дискретних глибинах в біологічній тканині шляхом застосування мідь-константанових термопар Т-типу для контролю ефективності, оформлено патент).*

11. Дронов О. І., **Хоменко Д. І.** Патент на корисну модель №119932, Україна, МПК А61В 17/00 А61В 18/02. Спосіб посилення процесу криофіксації резектабельної злоякісної солідної пухлини підшлункової залози дистильованою Н₂О. власник Дронов О. І., Хоменко Д. І. № у 201705020;

заявлено 24.05.2017; опубліковано 10.10.2017; Бюл. 19. *(Здобувачем запропоновано спосіб введення в біологічну тканину, в тому числі пухлинну, дистильованої води за 5 хв до початку локальної кріодії, обґрунтовано потенціуючі ефекти даного способу на клінічних прикладах, оформлено патент).*

Тези наукових доповідей:

12. **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 H₂O. Інновації в медицині: досягнення молодих вчених: 40-а ювілейна науково-практична конференція молодих вчених Національної медичної академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупика з міжнародною участю, присвячена Дню науки, м. Київ, 18 травня 2017 року: тези доповіді. Київ, 2017. С. 91–93. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).*

13. Dronov O. I., Kovalska I. O., **Khomenko D. I.**, Kozachuk Y. S., Bakunets P. P., Zemskov S. Cryofixation of Pancreas Resectable Malignant Solid Tumors. 19th World Congress of International Society of Cryosurgery, Kaunas, Lithuania, September 13–15, 2017: abstract book. Kaunas, 2017. P. 26–28. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).*

14. **Khomenko D.**, Kosachuk E., Teterina V. Potentiation of local cryoablation process on biological tissue via distilled H₂O. 68th Congress of the Association of Polish Surgeons, Cracow, September 27–30, 2017: abstract book. Cracow, 2017. P. 504. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).*

15. Dronov O. I., Zemskov S. V., **Khomenko D. I.** Clinical significance of the isolated tumor cell detection in the peritoneal lavage solution in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. Integrated clinical and pathogenetic

approaches in diagnosis and therapy of cancer: International scientific conference, Kyiv, June 13–15, 2016: materials. *Experimental Oncology*. – 2016. Vol. 38. №2. P. 131–132. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).*

16. Дронов А.И., Бакунец П. П., Земсков С.В., **Хоменко Д. И.**, Козачук Е. С. Метод криодеструкции в лечении больных с опухолью поджелудочной железы. Актуальные проблемы гепатопанкреатобилиарной хирургии: XXIV Международный Конгресс Ассоциации гепатопанкреатобилиарных хирургов стран СНГ, г. Санкт-Петербург, 19–22 сентября 2017 года: тезисы доклада. СПб., 2017. С. 158. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).*

17. **Хоменко Д. И.**, Лук'янова Н. Ю., Козачук Е. С. Результаты исследования процесса локальной криодии на экспериментальных моделях розчинів 36 % NaCl, дистильованої H₂O та 0,9 % NaCl та перспективи їх застосування при проведенні криофіксації солідних пухлин підшлункової залози. Здобутки клінічної та експериментальної медицини: Підсумкова науково-практична конференція, присвячена 60-річчю Тернопільський державний медичний університет, м. Тернопіль, 14 червня 2017 р.: тези доповіді. Тернопіль, 2017. С. 182–184. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей)*

ВПРОВАДЖЕННЯ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
 Національного медичного університету
 імені О.О. Богомольця
 професор Т.М. Черенько
 2018__р.



Акт впровадження

1. **Назва:** Комплекс вимірювальний інтраопераційний термопарний чотириканальний (КВІТ-4)
2. **Установа-розробник, її поштова адреса, прізвище, ім'я, по-батькові авторів:** Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, 01601, м. Київ, б-р Шевченка, 13, Дронов О.І., Хоменко Д.І., Луценко В.М., Жарков А.Я., Крутько О.А., Земсков С.В., Козачук Є.С.
3. **Джерело інформації:** патент на корисну модель № 116730 МПК (2006.01) А 61В 17/32
4. **Де і коли впроваджено:** кафедра загальної хірургії №1 Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, 2018 рік, протокол кафедрального засідання № 1 від 27. 08. 2018
5. **Термін впровадження:** 2018
6. **Загальна кількість спостережень:** 5
7. **Ефективність впровадження згідно з критеріями, викладеними в джерелі інформації:** Застосування "Комплексу вимірювальний інтраопераційний термопарний чотириканальний (КВІТ-4)" дозволив покращити результати лікування хворих на рак підшлункової залози; отримані дані в процесі впровадження способу дозволяють покращити зміст навчального матеріалу для студентів, лікарів інтернів та клінічних ординаторів та аспірантів за спеціальністю "хірургія" та "онкологія"
8. **Зауваження та пропозиції:** рекомендується для впровадження в науково-педагогічну та лікувальну роботу кафедр онкології та хірургії ВМНЗ.

Відповідальний за впровадження:
 Завідувач кафедри загальної
 хірургії № 1, д.мед.н., професор

О.І. Дронов

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

в. о. директора ДУ «Національний інститут
хірургії та трансплантології
імені О. О. Шалімова» НАМН України
чл.-кор. НАМН України

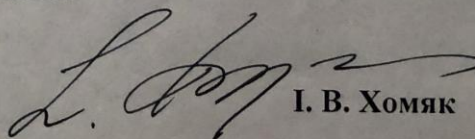
д.мед.н. проф М. Ю. Ничитайло

«» 2018__ р.

Акт впровадження

1. **Назва:** Комплекс вимірювальний інтраопераційний термопарний чотириканальний (КВІТ-4)
2. **Установа-розробник, її поштова адреса, прізвище, ім'я, по-батькові авторів:** Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, 01601, м. Київ, б-р Шевченка, 13, Дронов О.І., Хоменко Д.І., Луценко В.М., Жарков А.Я., Крутько О.А., Земсков С.В., Козачук Є.С.
3. **Джерело інформації:** патент на корисну модель № 116730 МПК (2006.01) А 61В 17/32
4. **Де і коли впроваджено:** Відділ хірургії підшлункової залози та реконструктивної хірургії жовчновивідних проток, НІХТ ім. О. О. Шалімова, 2018 рік, протокол методичного засідання № 1 від 26. 01. 2018
5. **Термін впровадження:** 2018
6. **Загальна кількість спостережень:** 5
7. **Ефективність впровадження згідно з критеріями, викладеними в джерелі інформації:** Застосування “Комплексу вимірювальний інтраопераційний термопарний чотириканальний (КВІТ-4)” дозволив покращити результати лікування хворих на рак підшлункової залози; отримані дані в процесі впровадження способу дозволяють покращити зміст навчального матеріалу для лікарів інтернів та клінічних ординаторів та аспірантів за спеціальністю “хірургія” та “онкологія”
8. **Зауваження та пропозиції:** рекомендується для впровадження в науково-педагогічну та лікувальну роботу хірургічних та онкологічних стаціонарів.

Відповідальний за впровадження:
Головний науковий співробітник
Відділу хірургії підшлункової залози
та реконструктивної хірургії
жовчновивідних проток,
д.мед.н., професор


І. В. Хомяк