

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Дамиев Ахмед Дэнилбекович

**Эффективность применения карбоксикриоабляции ткани почки,
предстательной железы и мочевого пузыря в эксперименте**

3.1.13. Урология и андрология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор
Газимиев Магомед-Салах Алхазурович

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 История криотерапии.....	12
1.2 История современной криохирургии.....	12
1.3 Криоабляция.....	15
1.4 Криобиология.....	16
1.5 Оборудование, используемое в криотерапии.....	19
1.6 Криоабляция гиперплазии предстательной железы.....	24
1.7 Абляция.....	26
1.7.1 Ультразвуковая абляция.....	26
1.7.2 Необратимая электропорация (NanoKnife).....	28
1.7.3 Трансуретральная игольчатая абляция.....	29
1.7.4 Акваабляция.....	30
1.7.5 Карбоксикриоабляция в литературе.....	31
1.8 Экспериментальные исследования в литературе.....	33
1.8.1 In vitro экспериментальные исследования криоабляции свиной почки.....	33
1.8.2 In vivo экспериментальные исследования криоабляции свиной почки.....	35
1.8.3 In vitro экспериментальное исследование удаленной предстательной железы.....	37
1.8.4 In vivo экспериментальное исследование криоабляции мочевого пузыря свиньи.....	38
1.9 Заключение.....	39
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	41
2.1 Криоабляция.....	42
2.1.1 Материально-техническое обеспечение.....	42
2.1.2 Описание системы ErbeCryo 2 для криотерапии.....	43
2.2 Игла эндоскопическая пунктирующая.....	47
2.3 Термопара.....	49

2.4 Гистологическое исследование.....	49
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	51
3.1 In vitro экспериментальное исследование («неживая» свиная почка).....	51
3.2 In vivo экспериментальное исследование («живая» свиная почка).....	53
3.3 In vitro экспериментальное исследование (удаленная предстательная железы).....	69
3.4 Криобиопсия и криоэкстракция опухоли мочевого пузыря.....	81
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	93
ВЫВОДЫ.....	96
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	97
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	98
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	99

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Технологический прогресс и стремительное развитие медицины способствуют активному внедрению в медицинскую практику достижений современной науки и техники [30]. В настоящее время медицина в целом неразрывно связана с лазерными, робот-ассистированными, ультразвуковыми и криогенными хирургическими комплексами.

Криохирургия является одним из наиболее перспективных направлений современной хирургической практики, в основе которого лежит применение различных режимов температурного воздействия на биологические ткани [15].

Использование низких температур на биологических тканях в сравнении с другими биофизическими воздействиями имеет ряд преимуществ. К ним относятся: малая кровопотеря (незначительная в сравнении с традиционными методами лечения), малая инвазивность, короткий срок пребывания пациента в стационаре и связанный с ним экономический эффект, быстрый восстановительный период и быстрая реабилитация пациента, хороший косметический эффект. Ко всему перечисленному стоит добавить, что при криохирургии присутствует криоиммунный эффект. Доказано, что локальное воздействие низких и сверхнизких температур на молекулярном уровне не приводит к необратимому разрушению белков и нуклеиновых кислот. Криовоздействие на биологические ткани как с признаками воспаления, так и с признаками опухолевого роста способствует активации и стимуляции различных механизмов специфического иммунитета [21, 25, 26, 30]. В настоящее время залогом повышения качества медицинской помощи является активное внедрение в клиническую практику всех современных, доступных и эффективных методов диагностики и лечения, в том числе лазерного и криохирургического оборудования, ультразвуковых и роботизированных хирургических комплексов [15, 30, 22].

Активное применение криоаппаратов в клинической практике ставит новые задачи повышения эффективности использования низких температур в лечении различных заболеваний и расширения области применения методов криохирургии. Лучше всего в этом направлении себя зарекомендовали малоинвазивные многозондовые криохирургические аппараты. В сравнении с одиночными криоинструментами их действие заключается в создании сферической зоны деструкции и некроза в патологически измененных биологических тканях. Также несомненным преимуществом криохирургии является возможность его применения, когда использование стандартных, классических методов лечения (открытого или лапароскопического хирургического вмешательства) невозможно по ряду причин (тяжелый соматический статус, заболевания крови, отказ пациента от предложенного метода лечения).

Временной промежуток, начиная с первого применения криохирургии, вплоть до настоящего времени указывает на то, что, несмотря на возникновение определенных ограничений и трудностей в области применения данного метода, с каждым днем быстроразвивающаяся медицина расширяет границы показаний к применению криохирургии. Этому в большой степени способствовало внедрение в практику ультразвуковых диагностических систем, мультиспиральной компьютерной томографии (МСКТ) и магнитно-резонансной томографий (МРТ), позволяющие в режиме реального времени оценивать и контролировать зону формирующейся деструкции и некроза ткани. А разработка новых криоаппаратов и криозондов повысила эффективность данного метода лечения и существенно расширила показания в применение метода в клинической практике.

В настоящее время в урологической практике для лечения новообразований почки и простаты активно используется одна из методик криохирургии – криоабляция. Метод основан на быстром замораживании и последующем быстром размораживании тканей почки или простаты с помощью специальных зондов, в результате которого наступает некроз прилежащих к рабочей части зонда тканей с последующей их гибелью, отторжением и резорбцией [49].

Криоабляция нашла свое применение в лечении пациентов с почечно-клеточным раком, либо раком предстательной железы (ПЖ), у которых в связи с тяжелыми сопутствующими заболеваниями традиционное оперативное вмешательство под общим наркозом не может быть выполнено или может быть сопряжено с угрозой для жизни. Криоабляция выполняется аппаратами третьего и четвертого поколения, основную роль хладагента в которых выполняют гелий и аргон.[15].

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время в литературе подробно изучены и отражены механизмы и эффекты воздействия на ткани почки и предстательной железы с применением криоаппаратуры на основе аргона и гелия. При этом опубликованных работ по оценке использования углекислого газа для выполнения криовоздействия в доступной литературе нет [15].

Немаловажным фактором возможного широкого применения углекислого газа для криохирургии является экономический эффект и доступность – углекислый газ дешевле аргона и гелия, и он есть практически во всех операционных, где выполняются лапароскопические, ретроперитонеоскопические и роботические оперативные вмешательства. Кроме этого, в условиях экономических санкций, импортозамещения, отсутствия на российском рынке отечественных криоустановок для применения в урологической практике делают актуальным и целесообразным проведение исследований влияния низких температур углекислого газа и возможности его использования в качестве хладагента при криоабляции тканей почки, мочевого пузыря и предстательной железы [15].

Цель и задачи исследования

Цель исследования – оценка возможности применения углекислого газа в качестве хладагента для криоабляции, криобиопсии и криоэкстракции в урологической практике.

Задачи исследования:

1. В эксперименте *in vitro* и *in vivo* оценить влияние низких температур с применением углекислого газа на ткань почки.
2. В эксперименте *in vitro* оценить влияние низких температур с применением углекислого газа на ткань предстательной железы.
3. Отработать режимы карбоксикриоэкспозиции *in vitro* и *in vivo* на ткани почки.
4. Отработать режимы карбоксикриоэкспозиции *in vitro* на ткани предстательной железы.
5. В эксперименте *in vitro* оценить влияние низких температур углекислого газа на ткань опухоли мочевого пузыря, возможность выполнения и эффективность карбоксикриобиопсии и карбоксикриоэкстракции опухоли мочевого пузыря.

Научная новизна

Представленная работа впервые в отечественной и зарубежной литературе направлена на изучение влияния низких температур углекислого газа на ткани почки, предстательной железы и опухолевых тканей мочевого пузыря.

В результате проведенных экспериментальных исследований *in vivo* и *in vitro* установлена возможность использования углекислого газа в качестве хладагента при криоабляции, криобиопсии и криоэкстракции. Криоабляция на основе углекислого газа (карбоксикриоабляция) [15], при заданных параметрах и используемом в эксперименте оборудовании, приводит к необратимой гибели (некрозу) ткани почки, но не приводит к необратимой гибели (некрозу) ткани

предстательной железы. Криобиопсия опухоли мочевого пузыря с применением углекислого газа (карбоксикриобиопсия) позволяет получить полноценный, более качественный биопсийный материал, по сравнению с традиционной трансуретральной (ТУР) биопсией, так как полностью исключает эффект коагуляции ткани опухоли мочевого пузыря и окружающей здоровой ткани.

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведенные нами экспериментальные исследования позволили изучить морфологические изменения и процессы, происходящие в ткани почки, предстательной железы и мочевого пузыря после карбоксикриоабляции и карбоксикриобиопсии.

Полученные результаты исследования повышают актуальность изучения эффективности и безопасности применения методов карбоксикриоабляции и карбоксикриобиопсии. В дальнейшем опыт применения углекислого газа в качестве хладагента может быть использован для проектирования и создания отечественных криоустановок, с последующим их внедрением в рутинную клиническую практику.

Данные проведенных экспериментальных исследований *in vitro* и *in vivo* послужат основой для проведения научных исследований по направлению криобиопсии и криоабляции на основе углекислого газа.

Методология и методы исследования

Работа представляет собой экспериментальное клиническое исследование. Объект исследования – криоабляция и криобиопсия тканей почки, предстательной железы и мочевого пузыря с использованием углекислого газа в качестве хладагента. Для решения поставленных задач использовался комплекс аналитических, экспериментальных, инструментальных и лабораторных методов. Полученные данные проанализированы и систематизированы. Результаты

изложены в главах диссертационного исследования. На основании итоговых данных сформулированы выводы и практические рекомендации.

Положения, выносимые на защиту

1. Карбоксикриоабляция (при заданных параметрах и использованном оборудовании), приводит к необратимой гибели (некрозу) ткани почки, но не приводит к необратимой гибели (некрозу) ткани предстательной железы.

2. Оптимальным режимом карбоксикриозэкспозиции для ткани почки при котором достигается некроз ткани диаметром 1,0 см. является одинарный цикл заморозки длительностью 120 секунд.

3. Углекислый газ может быть использован в качестве хладагента криоабляции для достижения полноценного некроза ткани почки в урологической практике.

4. Криобиопсия и криоэкстракция опухоли мочевого пузыря на основе углекислого газа позволяет получить полноценный и более качественный биопсийный материал для проведения патоморфологического исследования, чем традиционная ТУР-биопсия.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации в полном объеме соответствуют паспорту научной специальности 3.1.13. Урология и андрология. Результаты диссертационной работы соответствуют области исследования специальности – 3 пункту направления исследований паспорта специальности.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов, выводов и рекомендаций в рамках диссертационной работы подтверждается полнотой и глубиной исследования морфологических изменений и процессов, происходящих в тканях почки и предстательной железы в ходе проведения экспериментальных исследований *in vitro* и *in vivo* при различных режимах криоэкспозиции. Апробация диссертации состоялась 22.02.2024 года в Институте урологии и репродуктивного здоровья человека ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Основные положения и результаты диссертационного исследования представлены и обсуждены на XXIII конгрессе Российского общества урологов (Россия, Казань, 14–16 сентября 2023 года).

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие во всех этапах диссертационного исследования – от постановки задач, их теоретической, технической и экспериментальной реализации до обсуждения результатов возможных научно-исследовательских разработок для дальнейшего внедрения результатов исследования в клиническую практику, научно-образовательную деятельность. Автором проведена аналитическая работа по теме исследования и смежным темам. Разработан план проведения экспериментального исследования *in vitro* и *in vivo*. Автор самостоятельно проводил экспериментальную криоабляцию тканей почки и предстательной железы при заданных параметрах, оборудовании и режимах криоэкспозиции в соответствии с разработанным планом. Также самостоятельно проведена обработка полученного материала с последующей оценкой результатов. Все полученные результаты полностью отражены в тексте диссертации. Автором подготовлены статьи и доклады по материалам диссертационной работы.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертационного исследования опубликовано 3 печатные работы, из которых: 2 оригинальные научные статьи в медицинских журналах, входящих в международную базу цитирования Scopus, 1 статья в издании, входящим в Перечень ВАК при Минобрнауки России.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 111 страницах компьютерной верстки, состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, заключение, включающее обсуждение результатов, выводы, практические рекомендации, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, содержащего 119 источников. Диссертация иллюстрирована 1 таблицей и 64 рисунками.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 История криотерапии

Еще в древности люди и лекари были осведомлены о способности низких температур снимать боль и воспаление, снижать температуру тела, повышать сопротивляемость организма неблагоприятным воздействиям [6]. Известно, что холод применялся в Древней Греции еще за 3500 лет до новой эры при лечении инфицированных ран. Древние египтяне, а позже Гиппократ, Гален и Авиценна, зная о противовоспалительных и болеутоляющих свойствах холода, использовали его при лечении различных ран, которые воины получали в бою [6, 67, 118]. Н. И. Пирогов широко применял охлаждение для лечения ран. Он писал в своих работах: «Холод безусловно, назначается там, где опухшей горячей и раздраженной ране присоединяется паренхиматозное (капиллярное) кровотечение». Французский армейский хирург de Larrey в период войны 1812 г., отметил, что если раненые солдаты долго лежали в снегу, то можно было безболезненно производить ампутацию поврежденных конечностей [6, 16]. Данный метод был возрожден во времена Великой Отечественной войны выдающимся отечественным хирургом С.С. Юдиным. Достаточно напомнить, что после операций, родов, при лихорадочных состояниях или при травмах всегда назначается компресс со льдом [12]. В середине 19 века Джеймс Арнотт использовал аппликации из морской воды и колотого льда (до -24 °С) для замораживания опухоли молочной железы, шейки матки и кожи [6, 39]. После процедуры уменьшалась болевая симптоматика, а также интенсивность кровотечений [5, 39].

1.2 История современной криохирургии

История развития современной криохирургии относительно коротка и тесно связана с разработками в сфере физики низких температур [5].

Со второй половины 20 века наиболее доступным и популярным криогеном был углекислый газ [5]. Однако устройства для криохирургии, основанные на применении сжатого кислорода и углекислого газа, могли обеспечить заморозку лишь на глубину нескольких миллиметров и нашли применение в дерматологии и гинекологии [101]. Этим и объяснялось ограничение применение углекислого газа в медицинской практике, в особенности в урологической практике [5].

Широкое применение в качестве криогена получил жидкий азот, и уже в конце 1950 г. стал широко применяться в клинической практике. Н. Allington первым использовал его в лечебных целях в 1950 году, так как он выяснил, что свойства жидкого азота очень схожи со свойствами жидкого воздуха и кислорода [5]. Используя ватный тампон, он лечил различные доброкачественные образования, однако, слабая теплопередача между тампоном и кожей делала этот метод неподходящим для лечения опухолей [5, 37, 47].

В 1953 г. американский ученный I.S. Corper внес огромный вклад в развитие современной криохирургии, разработав зонд с жидким кислородом, способный обеспечивать температуру воздействия -196°C [47]. С его помощью автор метода лечил болезнь Паркинсона и другие двигательные нарушения, замораживая таламус, а также считавшиеся неоперабельными опухоли мозга [48]. Работа I. Corper вызвала взрыв интереса к жидкому азоту [16]. Corper стал основоположником эры криоабляции с использованием жидкого азота для выполнения криоабляции базального ганглия [48]. Его аппарат с жидким азотом был аналогичен многим современным криоабляционным системам, в которых все, кроме кончика зонда, было изолировано, и термopара измеряла температуру дистального зонда. Corper успешно лечил тысячи пациентов с тремором и непроизвольными движениями, характерными для Паркинсонизма до появления Леводопы в конце 1960-х. В 1960-е года также были произведены первые исследования по изучению ткани почек и простаты.

Эксперименты на животных, позволили применить криохирургическое воздействие в ряде областей медицина. В 1964 году Gonder и соавторы стали первооткрывателями криотерапии предстательной железы, применив жидкий азот

на простате собаки. Они смогли продемонстрировать послеоперационный некроз, резорбцию и уменьшение размеров предстательной железы [70]. В последующем была выполнена первая криоабляция предстательной железы собаки при помощи жидкого азота с использованием трансуретрального датчика. Проведение манипуляции контролировалась пальпаторно *per rectum* [70]. В 1968 г. Soanes с соавт. опубликовал собственный опыт выполнения криоабляции у 50 больных раком предстательной железы [105]. Однако, на протяжении 1970-х и в 1980-х годах криоабляция при раке предстательной железы была сопряжена с осложнениями из-за недостаточной точности позиционирования зонда во время фазы замораживания, и применялась крайне редко.

В 1974 году впервые была выполнена криоабляция почки в эксперименте на животных [107]. Но из-за сложности самой процедуры и громоздкой техники выполнения данная методика не получила широкого применения в клинической практике. В начале же 1960-х годов благодаря инициативе Канеля Э.И. были созданы криохирургические аппараты (криодеструктор программного регулирования криовоздействия 01 и 02), которые применялись в гинекологии и в лечении опухолей костей [27]. В 1968 советский ученый Фрейдович В.И. впервые применил метод криодеструкции при доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ГПЖ) при помощи жидкого азота [28]. Однако, отсутствие возможности точного контроля процесса замораживания приводило к высокой частоте осложнений (ректальные фистулы, отхождение струпа слизистой оболочки уретры, недержание мочи) [32]. В 1972 г. Flocks R.H. использовал введение криодатчика через разрез промежности под визуальным контролем, а в 1974 г. впервые было применено введение криоигл через прокол кожи промежности [32, 62, 86]. Одна игла 18 Fr вводилась несколько раз в разные участки предстательной железы под контролем пальца, находящегося в прямой кишке. Частота осложнений при промежностном доступе снизилась, однако, из-за невозможности мониторинга границ замораживания ткани данная методика оставалась в целом неприменимой, в связи с чем интерес к криотерапии рака простаты снизился вплоть до конца 1980-х г. [5, 113].

Огромный вклад в современную криохирургию внес Onik G.M в 1988 году. Его работа посвящена контролю за процессом формирования ледяного шара при помощи ультразвукового исследования (УЗИ). Но существенным недостатком трансректального ультразвукового исследования (ТРУЗИ) была невозможность контроля за температурными показателями как внутри, так и снаружи «ледяного шара» [63, 113]. Это привело к разработке температурных сенсоров в 1994 г., что обеспечило точное достижение требуемой температуры и способствовало значительному повышению эффективности лечения [32].

Дальнейшему успеху криотерапии способствовало внедрение Cohen J.K. в середине 90-х годов в практику уретрального катетера, согревающего слизистую оболочку уретры, что привело к снижению частоты недержания мочи, стриктуры уретры и отхождения струпа мочеиспускательного канала [9, 32, 46].

1.3 Криоабляция

Технологический прогресс и стремительное развитие науки способствует открытию все более эффективных и менее инвазивных методов лечения. В последние годы все большую популярность и внимание урологического сообщества приобретает криоабляция – процедура местного локального низкотемпературного воздействия на ткани, которая приводит к девитализации с образованием контролируемой зоны некроза. В результате воздействия происходит деструкция пораженной ткани с последующим формированием четкой демаркационной линии [5, 8, 13, 49].

В урологической практике данная методика нашла применение в лечении опухоли почки и рака предстательной железы [8]. В 1996 году Американская урологическая ассоциация перестала считать данную методику экспериментальной и признала криоабляцию предстательной железы методом терапии локализованного рака предстательной железы (РПЖ), а в 2009 году к этому мнению присоединилась и Европейская ассоциация урологов [8, 32].

На данный момент криоабляция применяется в лечении заболеваний органов мочеполовой системы. Несмотря на то, что данная криометодика чрезвычайно перспективна, понадобятся дальнейшие исследования, показывающие оценить эффективность в сравнении с традиционными методами лечения [11].

1.4 Криобиология

Еще до образования ледяных кристаллов в ткани происходят компенсаторные сдвиги, которые постепенно, по мере снижения температуры, переходят в необратимые патологические изменения [60, 83, 99]. Механизм гибели клетки основан на чередовании фаз замораживания и оттаивания. Сама процедура базируется на установленных общеизвестных криобиологических принципах, изначально сформировавшихся во время исследовательской работы по криоконсервации клеток и тканей и по патогенезу обморожения [9]. Физический эффект гибели клетки заключается в формировании внутри- и внеклеточных кристаллов льда [112]. При медленном замораживании значительные по форме кристаллы льда формируются в межклеточном веществе, тогда как при быстром замораживании формирование кристаллов льда происходит внутри клетки и в этом принципиальная разница между криоконсервацией и криоабляцией [5, 18].

При понижении температуры ниже 0 °C во внеклеточном пространстве формируются кристаллы льда, нарушающие структуру клетки, внутриклеточная жидкость выходит наружу, что создает гиперосмолярную токсичную среду внутри клетки. Дегидратация клетки способствует быстрому разрыву водородных связей в системе вода-белок. Повышается концентрация электролитов внутри клетки, что приводит к утрате фосфолипидов мембранами клеток и снижению pH ниже 6 [5, 91].

В процессе цикла замораживания-оттаивания лизосомы меняют свою проницаемость, а также подвергаются механическому повреждению. В конечном

итоге, гидролазы, находящиеся внутри клетки, вызывают денатурацию белков. Замораживание также способствует разрыву мембран митохондрий, нарушению крист и просветлению матрикса [5, 41, 73]. Дальнейшее нарушение клеточного метаболизма приводит к прекращению подвижности цитоплазмы и гистотипических функций [5, 40].

В случае понижения температуры ниже минус 20 °C образуются внутриклеточные кристаллы льда, которые разрывают клеточную мембрану. При последующей фазе оттаивания клетки разрушаются либо под воздействием гипергидратации, набирая жидкость из внеклеточного пространства, либо от формирования внутриклеточного льда в следующем цикле заморозки. Ключевыми факторами, которые приводят к гибели опухолевых клеток, является быстрота замораживания ткани и достигнутая минимальная температура. В исследовании, проведенном Lynch D.V., было показано, что чем выше скорость заморозки, тем больше клеток погибает от внутриклеточной кристаллизации [106]. Период размораживания должен происходить медленнее, так как при этом клеточная дегидратация выражена в большей степени [85]. Во время оттаивания происходит процесс рекристаллизации - слияние отдельных кристаллов льда, приводящих к созданию гипотоничной внеклеточной среды и дополнительному разрушению клеточных мембран [5, 32, 65, 64].

В экспериментах с различными тканями животных было установлено, что оптимальная летальная температура для опухолевых клеток находится в диапазоне от -40 до -50 °C [5]. По мнению Л. К. Лозина-Лозинского устойчивость различных клеток тканей охлаждению зависит от физиологического состояния и физических свойств клеток и тканей [19].

Оптимальная продолжительность цикла замораживания не установлена, однако доказано, что более продолжительное замораживание способствует более разрушительному эффекту на опухолевые клетки [32, 44].

Tatsutani K. и соавторы на базе Калифорнийского университета провели серию экспериментов *in vitro*, в результате которых было доказано, что для полного уничтожения раковых клеток необходимо достижение температуры -

минус 40 °С, и что проведение двух циклов замораживания более эффективно, чем одного [57]. К аналогичному результату пришел и Whittaker D.K., доказавший в своем исследовании, что внутриклеточных кристаллов льда образуется больше при повторном цикле замораживания [32]. Автор также установил, что увеличение интервала между циклами значительно улучшает эффективность криоабляции [115].

Важностью проведения второго цикла замораживания являлась возможность расширения границ ледяного шара по периферии [45]. Методика «олимпийских колец», предложенная Molnar St. и соавт. [87] может также существенно расширить границы ледяного шара, а благодаря тому, что за счет перекрывания каждый участок ткани подвергается криовоздействию более одного раза, вероятность гибели злокачественных клеток существенно увеличивается [5].

После быстрого замораживания и медленного оттаивания наступают термальный шок, сосудистый стаз, усиливается апоптоз [5, 9, 36]. Во время криодеструкции основным механизмом травмы является клеточная гипоксия в результате снижения циркуляции. В начале процесса замораживания происходит сужение кровеносных сосудов, что влечет за собой уменьшение притока крови вплоть до его полного прекращения в конце процесса замораживания. Длительная ишемия клетки активирует процессы перекисного окисления липидов, что еще больше усугубляет функциональное состояние структур клетки [5, 69].

Во время процесса оттаивания происходит компенсаторное расширение сосудов. Повреждение эндотелия кровеносных сосудов приводит к увеличению проницаемости стенок капилляров, отеку, агрегации тромбоцитов [5, 80]. При оттаивании кровеносных сосудов на их стенках формируются микротромбы, усиливающие уже существующую ишемию. Стагнация кровообращения продолжается в течение нескольких часов после завершения процедуры криоабляции. Перечисленные эффекты в конечном счете приводят к некрозу ткани [5, 88]. Наиболее быстрое замораживание достигается в непосредственной близости к криодатчику [5, 84].

По результатам проведенных исследований Gowardhan B. доказал, что при замораживании ткани формируется центральная зона полного клеточного некроза, размер которой зависит от выбранного типа криозонда и длительности криоэкспозиции. Повреждение клеток в этой зоне выражено в наибольшей степени [5, 71]. По периферии центральная зона окружена зоной клеточного повреждения (зона частичной криодеструкции) и зоной гипотермии (зона дегидратации клеток) [5].

Cytron S. и соавт. в своем исследовании доказали, что зона центрального некроза также может быть существенно расширена при втором цикле замораживания, когда повторное снижение температуры ткани до -40°C усиливает некроз [50].

Littrup P.J. и соавт. в эксперименте *in vivo* выявили корреляцию между ультразвуковым изображением и некрозом ткани предстательной железы [97]. Однако в дальнейшем было доказано, что ультразвуковой метод, используемый для контроля за формированием «ледяного шара», не позволяет достоверно оценить границу повреждения тканей [78], т.к. зона частичного повреждения может достигать 4 мм от края деструкции [66]. Исследования, проведенные в эксперименте *in vivo*, показали, что компьютерная томография и магнитно-резонансная томография также могут быть использованы для визуализации формирования «ледяного шара» [5], их информативность превосходит информативность УЗИ [90].

1.5 Оборудование, используемое в криотерапии

В клинической практике на данный момент применяется множество установок и аппаратов для проведения криотерапии. По принципу охлаждения они могут быть разделены на 4 группы [5, 30].

~установки и аппараты, использующие энергию фазового превращения (поглощение тепла, происходящее при изменении агрегатного состояния

хладагента, а именно переход из жидкого состояния в газообразное и переход из твердого состояния в жидкое) [5];

~ установки и аппараты, использующие термоэлектрический эффект Пельтье (термоэлемент, состоящий из двух последовательно соединенных полупроводниковых ветвей) [5];

~ газовые криогенные машины (использующие расширение хладагента с помощью газовой холодильной машины. Ввиду больших размеров и массы, ограниченного срока службы и высокой стоимости они не нашли широкого применения в клинической практике) [5];

~ установки и аппараты, использующие эффект Джоуля-Томсона (сжатый газ под высоким давлением поступает через редуктор в фильтр, где происходит его осушение. Затем в генеративном теплообменнике происходит охлаждение газа за счет обмена теплом с более холодным обратным потоком. После этого происходит дросселирование прямого потока - резкое снижение давления при прохождении газа через суженное отверстие) [5].

Стремительное развитие науки за последнее время в целом привело к существенному усовершенствованию криоинструментов (игл, аппликаторов). В зависимости от используемого хладагента аппараты для криотерапии делят на: аппараты, использующие жидкий аргон и аппараты, использующие газообразный аргон. Существует так же небольшое количество криоаппаратов, работающих на основе закиси азота, углекислого газа и фреона [5, 29].

В 1961 г. была разработана первая криоустановка, использующая в качестве хладагента жидкий азот. Аппарат назывался «Liude CE-2» и состоял из сосуда Дьюара для жидкого азота, системы проводников для подачи хладагента, криозонда с наконечником, изготовленным из серебра и системы для отвода паров. В том же 1961 г. его начали применять в нейрохирургической практике. Недостатками криоаппарата явились длительная экспозиция криовоздействия и медленный отогрев рабочей зоны зонда [5].

Аппарат Cryotom R-89 стал первым криоаппаратом, работающим на закиси азота. Он имел на конце криозонда специальные отверстия для создания эффекта

адгезии к пораженным тканям. Однако, в ходе применения данного препарата было обнаружено, что период криовоздействия на ткани более длительный, процессы некроза протекают вяло, а лечение эффективно лишь при опухолях небольших размеров [5].

В 1980-х годах в СССР был разработан фреоновый криоэкстрактор «КОФ-1», применяемый в основном в офтальмологии [5].

Перспективным в хирургии паренхиматозных органов явилось создание криоскальпеля [1]. Однако, учитывая высокие адгезивные способности последнего и гемостатический эффект в отношении лишь малых кровеносных сосудов, метод не получил широкого применения в клинической практике [5].

Значительное уменьшение диаметра криозондов привело к необходимости увеличения количества используемых криозондов, совместная работа которых увеличивает размер зоны криодеструкции и позволяет добиться однородности замораживания [7].

Разработанные криосистемы «Cryocare CS» и «SeedNet» позволяют осуществлять криодеструкцию пораженной ткани практически во всех отраслях медицины [7].

В последующие годы широкое распространение получили методики криодеструкции с введением в пораженную ткань криозондов. Разработанный криоаппарат «ERBE CRYO 6» позволил под контролем УЗИ осуществлять прицельную криодеструкцию опухолей [5].

На сегодняшний день имеется большое множество криохирургического оборудования. Их основными параметрами отличия являются: мобильность, применяемый хладагент, метод воздействия на биологическую ткань, принцип охлаждения [22].

Малогабаритные установки в основном работают на запасе хладагента, содержащегося в сменных баллончиках в составе аппарата, либо с помощью охлаждения рабочего наконечника в жидком азоте. К современным представителям данной группы относят: Cryopen, Криостик, Ак-криомед,

Cryomega и др. Хладагентами данных криоустановок являются закись азота или жидкий азот.

Большинство среднегабаритных криоустановок работает на запасе хладагента, также встречаются использующие для получения низких температур эффект Пельтье [22]. К ним относят КЭ-1, Крио-5, KCH 450 Automatic, Cryospray CS1, CryoPro и др. Хладагентами данных криоустановок является жидкий азот.

Существуют как узкоспециализированные стационарные аппараты, так и аппараты широкого применения. К ним относят: Крио-01, IceSense3, Cryocare Cs, Galil SeedNet. Хладагентами данных криоустановок являются жидкий азот, газообразный агрон высокого давления.

В настоящее время одним из аппаратов, работающих на основе углекислого газа, является ErbeCryo 2 компании Erbe Electromedizin, который нашел применение в торакальной хирургии. Принцип замораживания основан на эффекте Джоуля-Томсона [8]. Температура превращения углекислого газа в сухой лед составляет $-78,5^{\circ}\text{C}$ [13, 108]. С помощью криоустановки углекислый газ поступает на дистальный участок криозонда под высоким давлением [13]. При поступлении газ расширяется из-за высокой разницы давления между наружной и внутренней частью наконечника зонда. Эффект Джоуля-Томсона способствует быстрому охлаждению наконечника зонда. Диапазон достигаемых температур на наконечнике криозонда колеблется от -35 до -50°C , конкретная температура напрямую зависит от его типа, размеров и давления в цилиндре [13, 42]. Отвод декомпрессионного газа происходит через криоустановку в окружающую среду.

Чем быстрее происходит охлаждение, тем эффективнее внутриклеточное образование кристаллов и, следовательно, девитализация. При температуре от -10°C до -50°C /мин усиливается внутриклеточное образование кристаллов льда и тем самым обеспечивается девитализация клеток [59, 68]. А повторение циклов замораживания и оттаивания только увеличивают ее эффективность. Что касается же скорости оттаивания, то если биологическая ткань оттаивает медленно, происходит внеклеточная перекристаллизация, а также изменение внеклеточной и внутриклеточной концентрации физиологического раствора, которые

способствуют осмотическому лизису клеток. Поэтому фаза оттаивания максимально медленная, например, рекомендуется проводить пассивное оттаивание [59, 68].

В торакальной хирургии найдено множество применений гибким криозондам 1,1 мм, 1,7 мм, 1,9 мм и 2,4 мм. Широкая размерная линейка гибких криозондов определяет многоцелевой режим использования от криобиопсии целевых тканей, криоэкстракции инородных тел и опухолей до процедур криореканализации и криодевитализации [15]. Эндобронхиальная криобиопсия в настоящее время стала признанной и устоявшейся процедурой биопсии в торакальной хирургии и упоминается в различных руководствах. Эта процедура показала свою безопасность и эффективность в различных исследованиях, также как и использование гибких криозондов [52, 58, 100].

В 2018г. Jan-Thorsten K. и соавторы впервые применили гибкие криозонды *ex vivo* на свиных почках. Они провели *ex vivo* исследование, с целью сравнения стандартной уретерореноскопии с биопсией и криобиопсией с помощью гибкого криозонда верхних мочевых путей [51]. Проводилось сравнение двух групп. Первой группе проводилась стандартная уретерореноскопия с биопсией. Биоптаты были получены из почечных лоханок. Второй же группе проводилась криобиопсия с использованием гибкого криозонда компании Erbe Electromedizin диаметром 0,9мм. Гибкий криозонд проводился через канал гибкого уретерореноскопа. После наведения кончика гибкого криозонда на место желательной биопсии проводилась криозаморозка хладагентом CO₂ в течении 10 секунд. Сразу после истечения заданного времени криозаморозки образец ткани извлекался вместе с уретерореноскопом и гибким криозондом. Однако, чтобы избежать потери биоптата из-за размораживания зонда, локальное низкотемпературное воздействие осуществлялось до момента вывода уретерореноскопа и криозонда с биопсийным материалом за пределы просвета [15]. В результате исследования было отмечено, что с помощью гибкого криозонда были получены значительно большие образцы ткани мочевыводящих путей, также в криобиоптатах не наблюдалось артефактов сдавливания, нежели

при биопсии стандартными щипцами. Лучшие показатели гистологической оценки были достигнуты в образцах, полученных с помощью гибкого криозонда.

1.6 Криоабляция гиперплазии предстательной железы

Несмотря на успешное применение криоабляции в лечении больных раком почки и предстательной железы, за последние годы были осуществлены попытки применения низких температур при лечении доброкачественной гиперплазии предстательной железы [3].

В 1968 г. впервые в нашей стране была выполнена криодеструкция при доброкачественной гиперплазии предстательной железы при помощи жидкого азота [89]. Криодеструкция ГПЖ выполнялась у пациентов, страдающих тяжелыми сопутствующими заболеваниями различных органов и систем. Существовало три основных вида криодеструкции при ГПЖ: «слепая» - без визуального контроля, на открытом мочевом пузыре и трансвезикальная (под контролем цистоскопа, проведенного через ход ранее наложенной эпицистостомы) [20]. Однако, отсутствие точного контроля процесса замораживания приводило к высокой частоте осложнений (ректальные фистулы, отхождение струпа слизистой оболочки уретры, недержание мочи) [9, 32].

В работе Давакиджки Л.Ю. 1997 г. [10] криодеструкция ГПЖ проводилась пациентам с отягощенным сопутствующим фоном. Всем 52 пациентам была произведена трансвезикальная криодеструкция под эндоскопическим контролем (под контролем цистоскопа, проведенного через ход ранее наложенной эпицистостомы) криодеструктором ИД 23 на основе жидкого азота. У исследуемых больных были отмечены следующие осложнения: транзиторная гематурия 7,3%, уретроррагия 64,6%, обострение хронического пиелонефрита 14,6%, острый эпидидимит 6%. Период полного отторжения некротизированных масс в среднем составил от 2 до 3 месяцев. Уменьшение объема предстательной железы после криодеструкции составляло в среднем 39%. У 20 пациентов перед закрытием мочепузырного свища была выполнена цистография, которая показала

нормальную проходимость простатического отдела уретры, что свидетельствует об уменьшении объема простаты и возможности восстановления самостоятельного мочеиспускания после закрытия надлобкового мочепузырного свища

В 2007 г. Wang A. и соавторы [114] выполнили трансперинеальную криоабляцию ГПЖ под трансректальным ультразвуковым контролем 21 пациенту с отягощенным соматическим статусом. После проведенного лечения средняя скорость мочеиспускания увеличилась с $3,8 \pm 2,1$ мл/с до $17,0 \pm 5,8$ мл/с. У 15 из 21 пациентов возникла гематурия в течение первой же недели, а у 4 пациентов развилось недержание мочи легкой степени. Таким образом, даже несмотря на то, что происходило орошение уретры физиологическим раствором температурой 40°C , вероятно, произошло некоторое замерзание уретры. Повреждение уретры в этом исследовании подчеркивает ограничения криохирургии под контролем ТРУЗИ. Как только ледяной шар начинает формироваться, более глубокая визуализация нарушается сонографическим затемнением от края ледяного шара, ближайшего к датчику [95]. Хотя ТРУЗИ достаточно для визуализации стенки прямой кишки и предотвращения ректальных осложнений, оно не позволяет визуализировать всю уретру в достаточной степени, чтобы защитить ее во время абляции ГПЖ [89].

В 2011г. Pejman Ghanouni и соавторами была произведена трансперинеальная криоабляция ГПЖ под контролем магнитно-резонансной томографии (МРТ). Через 10 недель после проведенного оперативного вмешательства не было выявлено изменений общего объема простаты или переходной зоны. Но в конечном итоге криотерапия также приводит к уменьшению размера простаты после полной инволюции обработанной области, хотя для полной инволюции может потребоваться от 4 до 6 месяцев. [98] Также было отмечено уменьшение объема остаточной мочи со 187мл до 58мл и улучшение со стороны качества мочеиспускания: оценка симптомов AUA 23-> 13; пиковая скорость мочеиспускания 5,1 мл/с -> 10,3 мл/сек.

1.7 Абляция

Существует ряд конкурирующих с криохирургией технологий радиочастотной, микроволной, ультразвуковой абляции. Все эти методы не лишены недостатков и находят преимущественное применение в различных частных случаях, являясь методами выбора [22].

Абляция – это процедура, применяемая при лечении рака почки, РПЖ и ГПЖ. Во время процедуры абляции для уничтожения опухолевых клеток используется энергия (например, тепло, холод, лазерные лучи или химические вещества) [35]. Существуют различные методики абляции: игольчатая абляция, абляция с использованием энергии ультразвука высокой частоты, криоабляция и др.

1.7.1 Ультразвуковая абляция

Одним из прогрессивных малоинвазивных методов лечения рака предстательной железы (РПЖ) в настоящее время является метод ультразвуковой абляции (High Intensity Focused Ultrasound-HIFU) [2]. В основе данного метода лежит термическое разрушение ткани, вызванное воздействием ультразвуковых волн [17]. В процессе ультразвуковой абляции в очаге-мишени ультразвуковая энергия за счет эффекта кавитации преобразуется в тепло. Происходит нагревание ткани выше 65 С, что приводит к денатурации белка и развитию коагуляционного некроза [17, 54]. При этом воздействие обладает высокой точностью и приводит к минимальному повреждению рядом расположенных тканей [31].

Первые упоминания о воздействии УЗ-волн на различные микроорганизмы, а также ткани рыб и животных описаны в результатах работ R. Wood и A. Loomis в 20-ых годах XX века [117]. В дальнейшем в 1942г. Lynn J. G. и соавторы продемонстрировали в своих работах выраженный локальный нагрев тканей с помощью УЗ-волны, сфокусированной в одной точке [2, 82]. В 1956 году

советский инженер-изобретатель А. К. Буров предложил использовать ультразвуковые волны для лечения злокачественных опухолей, свидетельствуя о высокой эффективности сфокусированного УЗ в разрушении раковых клеток [4]. Однако, отсутствие возможности визуализации и контроля ограничило реализацию данного метода.

Создание в 1967 году Л.Д. Розенбергом уникального приемника, позволившего неинвазивно осуществлять наблюдение за воздействием УЗ в тканях путем измерения температуры и акустического поля, возможности увеличения кавитации, стало значительным прорывом в эволюции HIFU как метода лечения [24]. В 1995г. Madersbacher впервые сообщил о влиянии сфокусированного ультразвука высокой интенсивности (HIFU) в экспериментальном исследовании в лечении пациентов с РПЖ [56].

Дальнейшее внедрение таких диагностических методов как УЗИ и МРТ, сделало возможным в режиме реального времени оценивать результативность проводимой операции, с учетом контроля зоны воздействия сфокусированной волны [2].

Использование метода ультразвуковой абляции в онкоурологии прошло уникальный путь от первой операции, выполненной в 1999 году профессором Токийского университета Тореяки Ушида, до одного из основных способов лечения локализованного РПЖ [109].

В настоящее время с 2015 года метод HIFU включен в список методов лечения локализованного РПЖ по данным управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов (FDA) и Американской ассоциации урологов. Принимая во внимание результаты многочисленных исследований, посвященных изучению HIFU в лечении онкологических заболеваний, на сегодняшний день достаточно хорошо продемонстрированы результативность и хорошая переносимость данной операции, при этом выявлены вероятные интра- и постоперационные осложнения, а также изучены морфологические изменения в тканях [2].

1.7.2 Необратимая электропорация (NanoKnife)

Необратимая электропорация (НЭП) является новейшим малоинвазивным методом нетепловой абляции тканей. В процессе нетепловой абляции используются короткие импульсы постоянного тока высокого напряжения, создающие необратимые поры в клеточной мембране, вызывающие гибель клеток [94]. Изменение трансмембранного потенциала вызывает структурную перестройку билипидного слоя, создает поры в мембране, через которые проникают ионы. Необратимое нарушение проницаемости мембраны ведет к изменениям клеточного гомеостаза и гибели клетки [17, 102].

Необратимая электропорация имеет ряд преимуществ перед методами локального воздействия, основанными на изменениях температуры, так как не связана с тепловой энергией [17]. Соответственно окружающие опухоль сосуды не отводят тепло, таким образом, эффективность абляции не зависит от васкуляризации и интенсивности кровотока [17]. Кроме того, отсутствует риск поражения окружающих сосудов и нервов, что благоприятно сказывается на функциональных результатах. Импульсы постоянного тока разрушают клеточные компоненты ткани, в то время как коллагеновые волокна остаются целыми и таким образом, ткань сохраняет свою структуру [17]. Сеанс лечения методом НЭП значительно короче по сравнению с другими абляционными методами ($8,4 \pm 1,8$ мин), а площадь повреждения сравнима ($3,2 \times 2,5 \times 3,9$ см). После воздействия НЭП определяются четкие границы между пораженной и здоровой тканью. Сами импульсы поддаются через два электрода: 15 сантиметровый монополярный или биполярный. Дистальный конец электрода - неизолированный. Электрод подключается к генератору высокого напряжения, создающему импульс в 1000-3000 В и управляемому через компьютерный интерфейс. До процедуры оператор устанавливает число импульсов, длительность импульса, частоту повторения, напряжение. Процедура может выполняться под УЗ-контролем в реальном времени [17].

В 2007г. Edward W. и соавторы сообщили, что при УЗ-мониторинге во время сеанса НЭП визуализируются сферические гипоехогенные зоны абляции, которые, вероятно, связаны с высвобождением молекул воды из клеток после открытия мембранных пор под действием тока высокого напряжения [79]. Доклинические исследования НЭП на животных были проведены, чтобы установить профили безопасности, дозы и режимы воздействия, и ответы со стороны тканей. Так в 2007г. были проведены эксперименты с применением необратимой электропорации для абляции простаты собак. Данный эксперимент показал, что на фоне разрушения паренхимы органа сосудисто-нервные пучки остались интактными; также не было выявлено повреждения стенки прямой кишки или развития свищей [17, 92].

Из недостатков НЭП важно отметить необходимость глубокой миорелаксации, что требует ЭТН. Вследствие этого метод, несмотря на свою малоинвазивность, не подходит для ряда соматически ослабленных пациентов. Отчасти эту проблему решает новая модификация – высокочастотная НЭП, не вызывающая сильные сокращения мышц. Ещё одно противопоказание к электропорации – наличие кардиостимулятора.

На сегодняшний день ряд работ указывают на многообещающие онкологические результаты, низкую частоту послеоперационных осложнений и минимальное влияние на эректильную и мочевыделительную функцию. Но тем не менее, среднесрочных и долгосрочных данных о безрецидивной выживаемости по-прежнему не хватает [34]. В связи с чем необратимая электропорация является одним из вариантов фокальной терапии рака предстательной железы [2].

1.7.3 Трансуретральная игольчатая абляция

Трансуретральная игольчатая абляция (Transurethral needle ablation - TUNA), также называемая радиочастотной абляцией, является малоинвазивной методикой лечения при гиперплазии предстательной железы [2]. Первые исследования процедуры начались в 1993 году [111], а в 1996 году Управление по делам

продовольствия и медикаментов одобрило применение высокочастотной абляции для лечения гиперплазии предстательной железы.

Принцип метода заключается в нагреве тканей под действием высокочастотных и коротковолновых электрических токов. Это приводит к разрушению тканей путем термического некроза. Во время самой процедуры в гиперплазированные доли предстательной железы проводятся иглы. Энергия, доставляемая в ткань посредством игл, представляет собой высокочастотные радиоволны. Ткань нагревается до температуры 100-110°C и разрушается, одновременно с этим происходит коагуляция, что предотвращает кровотечение. Коагуляционный некроз происходит только на ограниченном участке, потому что радиоволны воздействуют на ткани только в месте контакта [119]. Трансуретральная игольчатая абляция зарекомендовала себя, как альтернативная методика лечения пациентов с гиперплазией предстательной железы.

1.7.4 Акваабляция

Акваабляция – это минимально инвазивная хирургическая методика лечения при гиперплазии предстательной железы, при которой используется физиологический раствор под высоким давлением для удаления гиперплазированной ткани предстательной железы с помощью механизма гидродиссекции без нагрева [38]. Под высоким давлением поддается высокоскоростная струя стерильного физиологического раствора с различной скоростью потока в зависимости от требуемой глубины проникновения, что приводит к селективной абляции железистой ткани предстательной железы.

Методика акваабляции впервые описана в 2015г., когда Keneeth F. и соавторы провели экспериментальное исследование, по акваабляции простаты собак [75]. По итогу было отмечено, что акваабляция приводит к удалению аденоматозной ткани предстательной железы с сохранением окружающих коллагеновых структур, таких как кровеносные сосуды и капсула предстательной железы. В настоящее время имеется ряд работ [61], указывающих на

преимущества акваабляции при гиперплазии предстательной железы в сравнении со стандартной трансуретральной резекцией, однако все еще существуют опасения по поводу наилучшего метода гемостаза после операции. В связи с чем акваабляция может быть рассмотрена, как альтернативная методика лечения [55]. Серьезным ограничением для внедрения метода является стоимость оборудования.

1.7.5 Карбоксикриоабляция в литературе

Анализ отечественной и зарубежной литературы показал, что в урологической практике криоабляция получила широкое применение. На основании литературных данных обсуждаются показания, противопоказания и осложнения криоабляции при раке почки и предстательной железы, а также отдаленные результаты лечения. Основным действующим хладагентом при выполнении криоабляции рака почки и предстательной железы является аргон.

Одним из возможных хладагентов для выполнения криоабляции является углекислый газ. Однако, в зарубежной и отечественной литературе не так много данных о проведении криоабляции с его использованием.

Так в 2005 г. Raju G. и соавторы выполнили карбоксикриоабляцию пищевода на модели свиньи [72]. Криоабляция проводилась криосистемой Polar Wand и одноразовым гибким криогенным спреем с использованием в качестве хладагента углекислого газа. Проводилось сравнение различных режимов криотерапии. По результату было отмечено, что низкие температуры углекислого газа приводят к некрозу всех оболочек пищевода, В зависимости от выбранного режима была отмечена взаимосвязь между длительностью цикла заморозки и глубиной поражения пищевода. Увеличение продолжительности цикла заморозки приводило к большему объему некротизированной ткани.

А уже в 2011г. Хуе Н. вместе с соавторами выполнили эндоскопическую карбоксикриоабляцию с использованием криосистемы Polar Wand пациентам с пищеводом Баррета без дисплазии или с дисплазией низкой степени [33]. По

результатам которой, у большинства пациентов отмечалось полное устранение желудочной метаплазии после криоабляции углекислым газом.

В 2012г. Lewis J. вместе с соавторами выполнили эндоскопическую карбоксикриоабляцию пациентке с 35-летним анамнезом язвенного колита [103]. При биопсии прямой кишки у пациентки гистологически подтвержден хронический колит с дисплазией низкой и высокой степени. Были предприняты две попытки удалить видимую дисплазию с помощью аргонноплазменной коагуляции, однако, последующая колоноскопия выявила рецидив. В дальнейшем пациентке была выполнена криоабляция с использованием углекислого газа. Проводилось пять сеансов с интервалом 8 недель, при каждом сеансе выполнялось восемь 15-секундных циклов заморозки. В процессе лечения не было выявлено никаких осложнений. Контрольная биопсия с гистологическим заключением не выявила дисплазии слизистой оболочки прямой кишки.

В 1994г. Pittrof R. и соавторы выполнили трансцервикальную карбоксикриоабляцию эндометрия при меноррагии [96]. В эксперименте принимали участие 67 женщин с длительными эпизодами меноррагии. Криоабляция выполнялась при помощи системы Endocryo на основе углекислого газа под УЗ-контролем. По итогу не было отмечено ранних и поздних послеоперационных осложнений, а 63% пациенток, наблюдавшихся в течение 18 месяцев, отметили улучшение менструальных симптомов.

В 2006г. Julia F. и соавторы [43] провели *in vitro* исследование карбоксикриоабляции миомы матки и эндометрия пациенток после гистерэктомии. В своей работе они использовали криоустановку Endocryo. По окончании исследования было выявлено, что криоабляция углекислым газом приводит к некрозу как миомы, так и эндометрия. Также не было обнаружено существенной разницы в изменении температуры и глубины некроза между ними.

1.8 Экспериментальные исследования в литературе

Для успешного проведения наших экспериментальных исследований и получения наиболее достоверных результатов мы ориентировались на ранее проведенные экспериментальные исследования *in vitro* и *in vivo* с использованием свиной почки и удаленной человеческой предстательной железы.

1.8.1 *In vitro* экспериментальные исследования криоабляции свиной почки

В 2002г. Christopher C. и соавторы провели экспериментальное исследование [53]. Их целью было сравнить гистологические изменения ткани свиной почки после выполнения криозаморозки *in vitro* (без перфузии), *in vivo* (через 2 часа после криоабляции) и *in vivo* (через 3 дня после абляции). Всего в эксперименте было задействовано 13 свиней: 5 свиней в группе *in vitro* (без перфузии), 5 свиней в группе *in vivo* (через два часа после криоабляции) и 3 свиньи в группе *in vivo* (72 часа после криоабляции). В первых двух группах криоабляцию выполняли на одной почке каждой свиньи, в третьей криоабляцию выполняли с обеих сторон. После интубации животного криоабляция выполнялась криозондом 3,4мм с использованием аргона и 15-минутным циклом. Второй группе криоабляцию выполняли через открытый перитонеальный доступ, а в третьей с помощью лапароскопического доступа. По завершению экспериментальных исследований в зависимости от заданного временного интервала выполнялась нефрэктомия с последующим гистологическим исследованием.

По итогу было отмечено, что некроз клеток достигался во всех трех группах, однако отличался по радиусу. Так, в группе без перфузии радиус некроза составлял 14мм, в группе через 2 часа после криоабляции радиус составлял 11мм и в группе через 72 часа после криоабляции радиус оставлял 10мм.

В 2010г. Jeniffer L. и соавторы провели экспериментальное исследование [77]. Целью исследования было предоперационное планирование криоабляции почек, основанное на изотермах, установленных при первичных экспериментах *in vitro* с использованием геля. Использовались криозонды PERC-17 CryoProbes (1,7мм) и IceRods (1,47мм), а также многоточечные термодатчики. Первичные эксперименты *in vitro* проводились в специальном резервуаре, заполненном прозрачным гелем для ультразвуковых исследований.

Криоабляция состояла из двух 10-минутных циклов замораживания с использованием аргона, разделенных 5-минутным активным оттаиванием. Термодатчики располагали перпендикулярно криозонду так, чтобы 15-миллиметровая отметка датчика не прилегала к криозонду. Всего было установлено 4 термодатчика, один из них устанавливали на расстоянии 5мм от кончика криозонда. Таким образом температуру измеряли в пределах 10 мм по обе стороны от криозонда в высоту и 20мм вдоль криозонда.

В дальнейшем были выполнены эксперименты *ex vivo* и *in vivo*. 6 самкам свиней после интубации выполнялась нефрэктомия. Удаленную почку фиксировали и устанавливали криозонд вместе с термодатчиками аналогично предыдущему эксперименту *in vitro*. После выполнения криоабляции проводился статистический анализ регистрируемых температур во всех трех экспериментах (*in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*).

При выполнении криоабляции температура существенно не отличалась вдоль зонда ни в одной категории экспериментов. Однако на расстоянии 10 и 20мм от криозонда в испытаниях *ex vivo* и *in vivo* регистрировались более высокие температурные показатели по направлению к дистальному концу криозонда. Также средняя температура на расстоянии 5 мм от конца криозонда *in vivo* была ниже при использовании криозонда CryoProbes, чем при IceRods. Для обоих криозондов температурные показатели *in vitro* были значительно ниже, чем в естественных условиях, и значительно ниже в категории *ex vivo*, чем *in vivo* на всех участках. По итогу было выявлено, что эксперименты с использованием геля

in vitro и эксперименты *ex vivo* не позволяют рассчитать характер замораживания *in vivo*.

1.8.2 In vivo экспериментальные исследования криоабляции свиной почки

В 1999г. John P. Long и соавторы провели *in vivo* экспериментальное исследование в области чрескожной криоабляции почки на модели свиньи [81]. Всего было отобрано 13 самок свиней (возраст 2-4 недели). Они были разделены по группам в зависимости от времени замораживания. У каждого животного в качестве мишени использовался нижний полюс левой почки. Сама процедура криоабляции выполнялась чрескожно под УЗ-контролем. В каждом случае иглу вводили на глубину 9-10мм. 1-ой группе криоабляция выполнялась с экспозицией в 3-4 минуты, во 2-ой группе режим экспозиции составлял 6-7 минут, 3-ей группе проводился двойной цикл замораживания по 10 минут. По завершении данного эксперимента ни одно животное не погибло. В результате данного эксперимента наиболее обширная зона некроза (размерами 4.0х3см) отмечена в 3-ей группе.

В 2011г. Jennifer L. Young с соавторами провели *in vivo* экспериментальное исследование с целью определения оптимальной продолжительности цикла замораживания для криоабляции почек [93]. В их эксперименте лапароскопическая криотерапия проводилась на 16-ти самках свиней. Криоабляция выполнялась системой Presice криозондом IceRod диаметром 1,47 мм с аргоном для замораживания и гелием для оттаивания. Проводилось сравнения между двойным циклом 1, 5 и 10-минутного замораживания, после достижения показателя термодатчика температуры минус 20С. Многоточечные термодатчики проводили на глубину в 2 см. Зонд с термодатчиками имели диаметр 1,47мм и термодатчики на 5, 15, 25 и 35мм от конца зонда. Таким образом, датчики на 5 и 15мм находились в пределах паренхимы почки. В трех группах криотерапию проводили до тех пор, пока 1 из 4 датчиков не показывал температуру минус 20С. После достижения заданной температуры активировали 1, 5 или 10-минутный цикл замораживания, затем проводилось активное

оттаивания гелием до тех пор, пока тот же датчик не регистрировал температуру 0С, после проводили 5-минутный цикл оттаивания. В дальнейшем снова проводили криоабляцию до достижения того же термодатчика температуры минус 20С, далее проводили второй цикл замораживания той же продолжительности, что и первый. Также имелась контрольная группа, состоящая из 6 испытаний с применением двойного 10-минутного цикла замораживания и 5-минутным активным оттаиванием между циклами.

По завершению всех испытаний проводилось патоморфологическое исследование. В результате не было никакой разницы в немедленном клеточном некрозе между двойными 1-, 5- или 10 минутными циклами замораживания после достижения температуры минус 20 С. Циклы замораживания, основанные на времени, привели к большей площади клеточного некроза, чем эксперименты в 3 группах, основанных на температуре.

В 2018г. John D. вместе с соавторами провели экспериментальное исследование [104]. Целью было сравнение зоны криоабляции однократного 15-минутного цикла замораживания с двойным 10-минутным циклом замораживания. Для эксперимента использовались 5 самок свиней. При помощи лапаротомического доступа обнажали правую почку и печень животного. В каждом органе выполнялось по два сеанса криоабляции. Каждая криоабляция выполнялась с использованием двух криоигл диаметром 2,1мм, расположенных параллельно на расстоянии 2-х см друг от друга с использованием криосистемы Visual-ICE, хладагентом которой является аргон. Первый режим криоабляции составлял 15 минут замораживания, второй режим криоабляции включал 10 минут замораживания, 8 минут оттаивания и 10 минут повторного замораживания. 15-минутный протокол был начат через 13 минут после начала двойного 10-минутного протокола, чтобы гарантировать одновременное окончание обоих циклов заморозки. Для определения границ криоабляции через правую бедренную артерию к почечной и печеночной артерии проводили ангиографический катетер. Сразу после окончания обоих циклов заморозки вводили контрастное вещество (магневист). После введения контрастного

вещества животных выводили из исследования перед фазой оттаивания, чтобы предотвратить реперфузию и ложное контрастирование в зоне криоабляции. По окончании эксперимента органы были извлечены и переданы для патоморфологического исследования.

По результату данного экспериментального исследования выявлено, что один 15-минутный цикл криоабляции позволяет достичь того же объема криоабляции, что и двойной 10-минутный цикл. Также было отмечено, что объем ледяного шара был больше при криоабляции печени по сравнению с почкой. Это связано с тем, что перфузия почки почти в 4 раза выше перфузии печени (4000мл/кг в минуту и 1000мл/кг в минуту) [116].

1.8.3 In vitro экспериментальное исследование удаленной предстательной железы

В 2004г. Bhowmick P. и соавторы провели экспериментальное исследование с целью оценки эффективности термической терапии при гиперплазии предстательной железы *in vitro* [76]. Десяти пациентам с локализованным раком предстательной железы была выполнена радикальная простатэктомия. После завершения оперативного пособия и удаления макропрепарата, из боковой доли каждой предстательной железы брали срез толщиной 1мм. Гиперплазия ткани была подтверждена гистологически. Срез разделяли на несколько полос ткани шириной 1мм и длиной 10-15мм. Далее кусочки ткани помещали на покровное стекло вместе с питательной средой и накрывали другим покровным стеклом. Медный столик с постоянной температурой, рассчитанный на температуру от минус 100С до плюс 100С, использовался для обработки образцов тканей. Конечная температура медного столика подтверждалась при помощи цифрового термометра. После достижения определенной температуры, покровное стекло помещали на медный столик и выдерживали при выбранных температурах (45-70С) в течение различных временных интервалов (1-60мин).

После термической обработки срезы ткани культивировали в течение 72 часов, а жизнеспособность оценивали при помощи гистологического исследования и поглощения флюоресцентных красителей. В результате необратимые повреждения гиперплазированной ткани предстательной железы 85-90% достигались термической обработкой при температуре 45 ° C в течение 60 мин, 50 ° C в течение 30 мин, 55 ° C в течение 5 мин, 60 ° C в течение 2 мин и 70 ° C в течение 1 мин.

Проанализировав все вышеизложенные экспериментальные исследования и ориентируясь на них, мы провели собственные экспериментальные исследования *in vitro* и *in vivo* свиной почки и *in vitro* удаленной предстательной железы.

1.8.4 *In vivo* экспериментальное исследование криоабляции мочевого пузыря свиньи

В 2007г. Nguby G. и соавторы провели экспериментальное исследование с целью оценки возможности выполнения трансуретральной криоабляции стенки мочевого пузыря на модели свиньи [110]. Эксперимент был осуществлен на 18 свиньях, разделенных на три группы. Криоабляция выполнялась криозондом диаметром 1,47мм и длиной 38см (Oncura, Plymouth Meeting) двумя циклами замораживания по 8 минут и одним циклом активного оттаивания в течение 3 минут. 1-ой и 2-ой группы была выполнена стандартная цистоскопия с постоянной ирригацией физиологическим раствором NaCl 0,9% комнатной температуры с последующей криоабляцией. 3-ей группе была выполнена цистоскопия с инсуффляцией мочевого пузыря газообразным диоксидом углерода с последующей криоабляцией. 1-ая и 3-ья группы были выведены из эксперимента через 1 неделю, а 2-ая группа была выведена через 3 недели после выполнения криоабляции. По результатам гистологического исследования отмечено, что в 1-ой и 2-ой группе диаметр полного некроза составлял 6,5мм и 2,3мм. Разницу в диаметре авторы объясняют процессами заживления. Диаметр полного некроза ткани в 3-ей группе составлял 8,2мм. Разница в диаметре некроза

ткани 1-ой и 2-ой группы по сравнению с 3-ей связана с тем, что криоабляция в жидкой среде имеет ограниченную абляционную способность, так как жидкость образует конвекционные потоки, что отводят холод. По итогу эксперимента зона полного некроза ткани мочевого пузыря была отмечена во всех 3-ех группах.

1.9 Заключение

Анализ литературных данных проведенных нами свидетельствует, что криоабляция является перспективным, малоинвазивным и малоизученным методом лечения новообразований почки, предстательной железы и мочевого пузыря, который, как было доказано рядом исследований [44, 88], демонстрирует эффективное и полное уничтожение клеток в определенном участке ткани на которое направлено его действие. В урологической практике криоабляция нашла достаточно успешное, но не очень широкое применение в лечении пациентов с новообразованиями почки и предстательной железы. В настоящее время основными веществами, используемыми в криоустановках для проведения процедуры криоабляции, являются аргон и гелий. Использование аргона в качестве хладагента для криоабляции тканей почки и предстательной железы подробно представлено в современной литературе [15]. Данных об использовании углекислого газа в криоустановках с целью низкотемпературного воздействия на ткани мочевого пузыря, почек и предстательной железы, а также исследований по вопросу влияния низких температур CO_2 на органы и ткани в отечественной и зарубежной литературе не найдено [13, 15].

С точки зрения актуальности широкого развития криохирургических методов лечения в медицинской практике нельзя ни обратить внимание на ряд факторов, которые с нашей точки зрения, существенно влияют на этот процесс: стоимость криохирургических операций, клиническая эффективность, безопасность, доступность, целесообразность.

Стоимость таких операций сегодня сильно зависит от применяемого оборудования, расходных материалов, распространенности методики, ее

доступности, квалификации медицинского персонала и прочее. Импортное оборудование и одноразовые комплектующие неизбежно и значительно влияют на стоимость операции. Однако, за рубежом, где применение дорогостоящего оборудования более обширно, это влияние заметно меньше [22]. Чем выше стоимость конкретной методики оперативного лечения, тем меньше ее доступность, это простые законы экономики. Отсюда следующая аксиома – чем меньше доступность методики, тем меньше клинического опыта и больше неэффективных и нежелательных результатов и больше осложнений. Любой метод лечения на его начальном этапе стоит дороже, эффективность его ниже и осложнений больше. Криохирургия в мире, в особенности в нашей стране находится на этапе развития. Отечественные образцы криоустройств, к сожалению, либо уже морально устарели, либо производятся в единичных экземплярах и ввиду этого также имеют относительно высокую стоимость, либо уже не отвечают современным требованиям. Все эти факторы сдерживают развитие криохирургии [22]. Современные хирургические методы, использующие робот-ассистированные системы, физические факторы, смогут полноценно конкурировать с традиционными в том случае, если стоимость оборудования и его технической поддержки не будет значительно влиять на стоимость операций, внедрение методик на местах не будет представлять из себя длительный процесс, а сами методики будут рекомендованы как в России, так и за рубежом в качестве методик выбора [22]. Снижение стоимости применения криохирургических методов, повышение их доступности, является одним из главных факторов для полноценного развития криохирургии сегодня в мире и в нашей стране [22].

Таким образом, проведение экспериментальных исследований с использованием углекислого газа в качестве хладагента при криоабляции и изучения влияния низких температур углекислого газа на ткань почки, предстательной железы и мочевого пузыря является актуальной научной задачей.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В рамках настоящей работы проанализированы результаты экспериментальных исследований *in vitro* и *in vivo* свиной почки, удаленной человеческой предстательной железы и *in vitro* опухоли мочевого пузыря с использованием системы 4-ого поколения ErbeCryo 2 (компания Erbe Electromedizin, Германия).

Исходно для проведения экспериментальных исследований нами была взята свиная почка, так как удельная теплоемкость тканей почки (3,89 кДж/кг/°K) и предстательной железы (3,80 кДж/кг/°K) почти эквивалентны, что делает свиную почку подходящей моделью для проведения экспериментальных исследований [74]. Учитывая малые размеры свиной предстательной железы (около 2,5см), ее использование в качестве материала для экспериментальных исследований было бы технически затруднительным и не позволило бы оценивать изменения ткани на достаточном расстоянии от зонда. В связи с этим первичные эксперименты были проведены на свиной почке, а конечные - на удаленной человеческой предстательной железе.

Первым этапом для определения оптимального режима криоэкспозиции нами проводились *in vitro* исследования на «неживой» свиной почке. Проводилась визуальная оценка диаметра ледяного шара, определение времени оттаивания криозонда, различных режимов криоэкспозиций при помощи криоустановки ErbeCryo 2.

Вторым этапом с целью первичного определения воздействия низких температур углекислого газа нами проводились *in vivo* исследования на «живой» кровоснабжаемой свиной почке при помощи лапароскопического доступа. Проводилось сравнение режимов криоэкспозиции при помощи криоустановки ErbeCryo 2 с дальнейшим патоморфологическим исследованием удаленного органа.

Третьим этапом для определения воздействия низких температур углекислого газа на ткань предстательной железы нами проводились *in vitro*

исследования на удалённой человеческой предстательной железе объемом не менее 50см³ после радикальной простатвезикулэктомии по поводу рака предстательной железы. Проводилось сравнение режимов криоэкспозиции при помощи криоустановки ErbeCryo 2, определение температурных характеристик в зоне криоабляции с дальнейшим патоморфологическим исследованием.

Четверым этапом для определения воздействия низких температур углекислого газа на ткань опухоли мочевого пузыря нами проводилась в эксперименте карбоксикриоэкстракция при помощи криоустановки ErbeCryo 2 фрагментов опухоли мочевого пузыря, полученных после трансуретральной резекции.

Пятым этапом проводилась карбоксикриобиопсия, карбоксикриоэкстракция при помощи криоустановки ErbeCryo 2 и ТУР-биопсия опухолевых тканей удаленного мочевого пузыря с целью определения сохранности и уровня качества полученного биоптата с последующим сравнительным анализом.

2.1 Криоабляция

2.1.1 Материально-техническое обеспечение

Экспериментальная работа проводилась с использованием криоустановки 4-го поколения ErbeCryo 2 (компании Erbe Electromedizin, Германия). Данная установка применяется для процедур криоэкстракции, криобиопсии, криореканализации и криодевитализации в торакальной хирургии. В урологической практике в рамках эксперимента криоустановка была применена впервые в мире.

В качестве хладагента ErbeCryo 2 применялся углекислый газ.

2.1.2 Описание системы ErbeCryo 2 для криотерапии

Криоустановка ErbeCryo 2 представлена блоком с панелью управления (Рисунок 1), ножным выключателем с педалью, разъемом для криозонда, шлангом газовым гибким длиной 1,0 м, шлангом для отвода отработанного газа длина 10 м, адаптером соединительным для газового баллона, сетевым кабелем, баллоном с углекислым газом (CO₂). Входное давление составляет 45-65 бар.



Рисунок 1 – Криоустановка ErbeCryo-2 с баллоном CO₂

Компания Erbe Electromedizin выпускает гибкие криозонды диаметром 1,1мм, 1,7мм, 1,9мм и 2,4мм. В зависимости от частоты использования гибкие криозонды делятся на две группы: для однократного применения, не подлежащие повторной стерилизации или обработке, так и для многократного применения, подлежащие повторной стерилизации или обработке. Чем больше диаметра гибкого криозонда, тем больше замораживающий эффект. В связи с чем в нашей работе все эксперименты были выполнены многократным гибким криозондом диаметром 2,4мм и длиной 1,15м. (Рисунок 2).

Гибкие криозонды чрезвычайно устойчивы к скручиванию и обладают значительной прочностью. При корректном использовании их можно применять и обрабатывать повторно до 100 раз. Гибкие криозонды обеспечивают доступ фактически к любой целевой зоне. В ходе применения можно активировать функцию заморозки суммарно не более 15 минут (без учёта пауз между включениями).

После подключения криозонда в разъем, система автоматически определяет размер криозонда. Соединительный штекер обеспечивает распознавание инструмента и конфигурацию соответствующих параметров в ErbeCryo 2. После этого функция «Flow Control» задает подходящие параметры для достижения оптимальных результатов при замораживании, в зависимости от размера зонда. Кроме того, уровень газа в баллоне и педального переключателя отслеживаются в реальном времени.

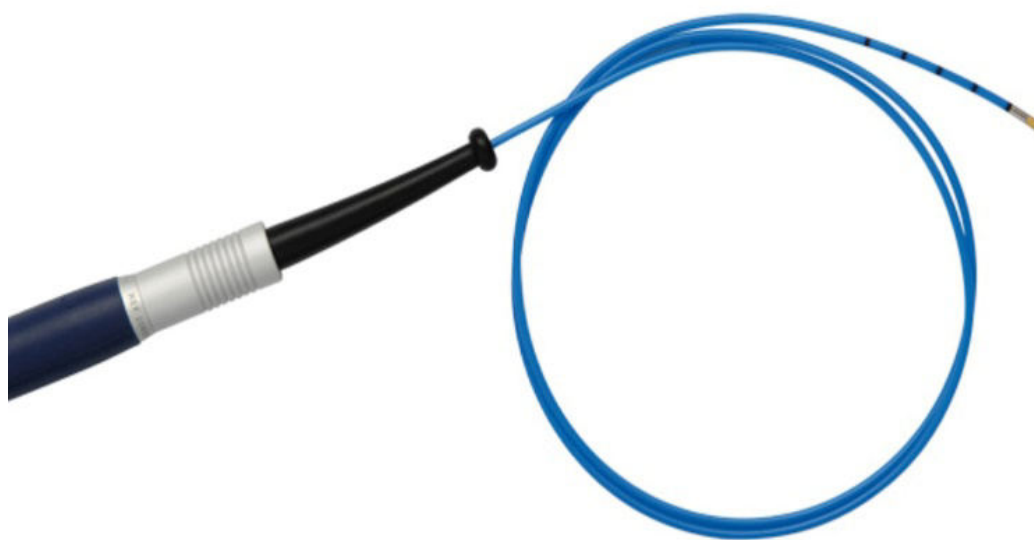


Рисунок 2 – Внешний вид криозонда Erbecryo-2 (Ø 2.4мм)

Перед началом проведения криозаморозки необходимо проверить исправность подачи углекислого газа. Для этого криозонд на 5 см в глубину погружают в стерильную воду или физиологический раствор NaCl комнатной

температуры. При достаточной мощности заморозки на наконечнике должен образоваться хорошо видимый однородный ледяной шар (Рисунок 3).

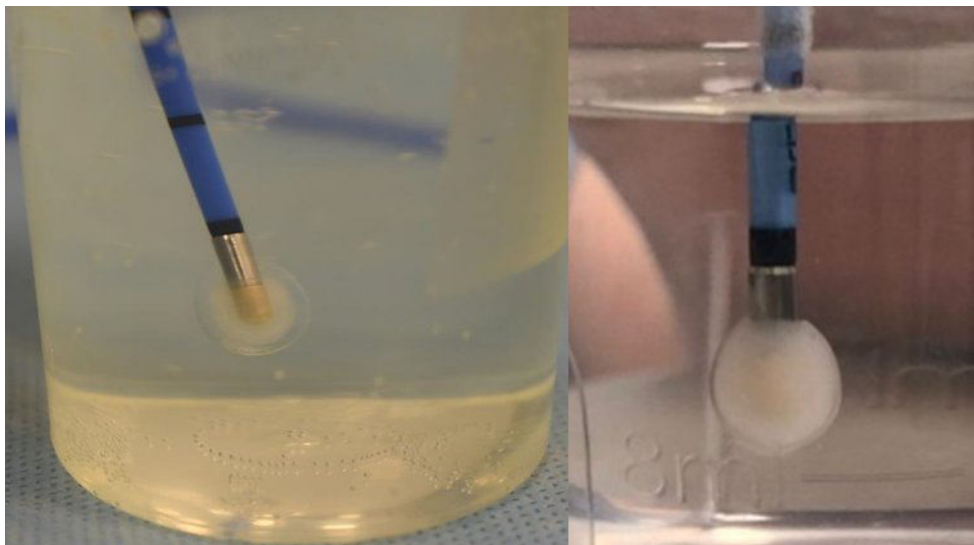


Рисунок 3 – Фото кончика зонда с ледяным шариком

В программе панели выбирается эффект 1 или 2. Путем выбора эффекта можно влиять на температуру наконечника. Минимальная достигаемая температура гибкого криозонда диаметром 2,4 при эффекте 1 составляет – минус 27,6 C(± 5 C), при эффекте 2 – минус 44,1(± 5 C). Чем больше эффект, тем холоднее наконечник криозонда. Расход газа при замораживании – 35-50гр/мин. Общая емкость двух газовых баллонов 20 кг. Программное обеспечение криоаппарата позволяет управлять потоком газа, идущего от баллона через систему распределительных трубок к кончику криозонда благодаря клапанной системе, предназначенной для достижения и поддержания необходимой температуры замораживания или оттаивания [5].

Низкотемпературное воздействие на ткани и локальная заморозка с использованием криохирургической установки ErbeCryo 2 становится возможным благодаря эффекту Джоуля-Томсона. Температура газа, используемого в качестве хладагента, снижается в условиях постоянного изменения давления при медленном движении газа через дроссель. На пути потока газа присутствует локальное препятствие – пористая перегородка (Рисунок 4). Температура превращения углекислого газа в сухой лед составляет -78,5 °C [13, 108]. С

помощью криоустановки углекислый газ поступает на дистальный участок криозонда под высоким давлением [13, 15].

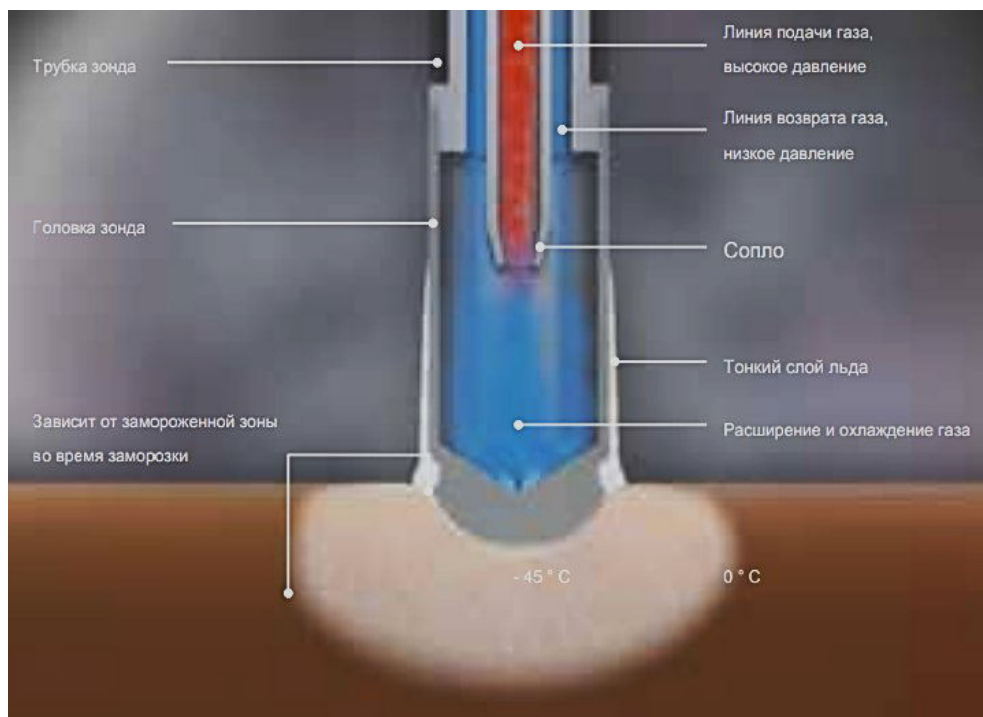


Рисунок 4 – Внутреннее устройство наконечника криозонда в поперечном сечении и визуализация образования ледяного шара

Регулирование скорости потока хладагента и времени локального замораживания происходит через криохирургическую установку. Наконечник криозонда и его подводящая часть имеют разницу в диаметре – полый наконечник намного шире, поэтому углекислый газ подвергается декомпрессии. Именно в этот момент возникает эффект Джоуля-Томсона, что приводит к резкому локальному снижению температуры дистального конца криозонда [15]. Возможная температура на наконечнике гибкого криозонда может быть от -35 до -50 °C. Конкретная температура напрямую зависит от его типа, размеров и давления CO_2 в системе [13, 15, 42].



Рисунок 5 – Схематическое изображение кривой охлаждения криозондом

ErbeCryo 2 является криоустановкой нового поколения. По сравнению с предыдущими криоустановками, использующими такой хладагент, как аргон, данная криоустановка имеет ряд особенностей:

- ~ Многоразовые гибкие криозонды;
- ~ Использование одного хладагента (углекислый газ);
- ~ Доступность и более низкая рыночная цена углекислого газа;
- ~ Упрощенная система использования ErbeCryo 2.

2.2 Игла эндоскопическая пунктирующая

Так как для проведения данного исследования мы использовали многоразовые гибкие криозонды, предназначенные для торакальной хирургии, конструкция которых не предназначена для вкола в ткани, для пункции почки или простаты и проведения гибкого криозонда криоустановки Erbecryo2 в экспериментах *in vitro*, *in vivo* нами использовалась игла эндоскопическая пунктирующая (ООО «НПФ «ЭЛЕПС»») (Рисунок 6). Длина составляет 320мм, а

диаметр 3 мм (Ch9). Игла состоит из основной части и внутреннего, атравматичного стилета. После выполнения пункции почки или предстательной железы внутренний атравматичный стилет удалялся и по просвету иглы нами проводился гибкий криозонд (Рисунок 7) с последующим выполнением криоабляции.

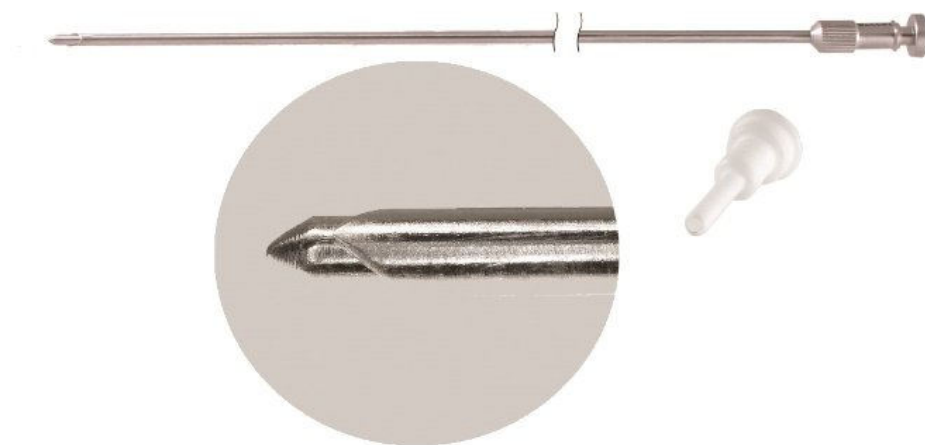


Рисунок 6 – Игла эндоскопическая пунктирующая



Рисунок 7 – Криозонд в просвете иглы эндоскопической пунктирующей

2.3 Термопара

Для определения температурных характеристик в зоне выполнения криоабляции нами использовались термопара типа К на основе сплава хромеля и алюминия (Рисунок 8). Они являются наиболее распространенными устройствами общего назначения с чувствительностью около 41 мкВ/°С. Применяются в температурных диапазонах от -200 °С до +1350°С. В неокисляющих и инертных условиях датчики типа К используются до 1260 °С.

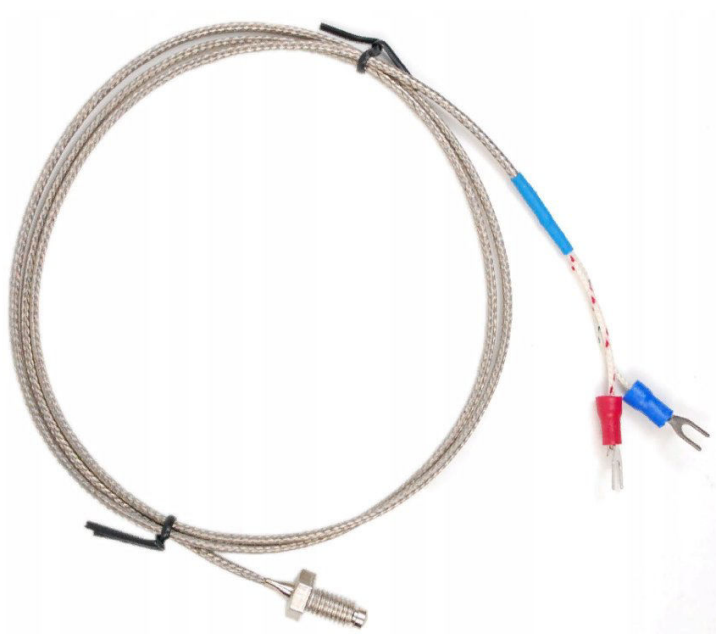


Рисунок 8 – Термопара типа К

2.4 Гистологическое исследование

Процедура приготовления гистологических препаратов была стандартной. Она включала фиксацию макропрепарата в 10% нейтральном формалине, проводку (дегидратацию) ткани, подверженной криоабляции, с последующей ее пропиткой парафином. Далее на микротоме выполнялись срезы приготовленных блоков с «шагом» 3 мкм. (Рисунок 9-10) [5].

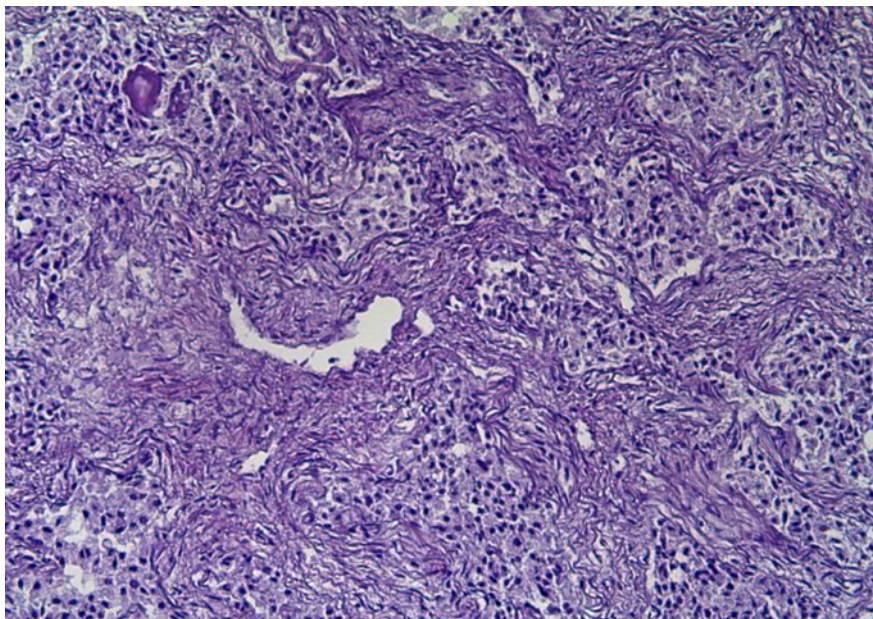


Рисунок 9 – Микроскопическая картина гиперплазии предстательной железы

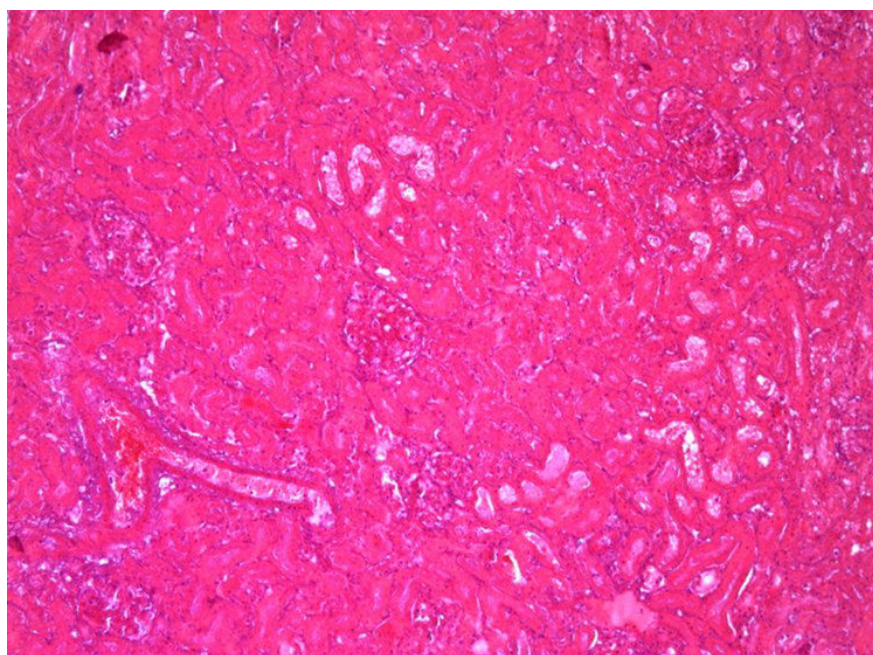


Рисунок 10 – Микроскопическая картина некроза ткани свиной почки

Окраска препаратов выполнялась с помощью эозина и гематоксилина [5]. При морфологическом исследовании исследуемого материала оценивались наличие зоны некроза, а также ее размеры.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 In vitro экспериментальное исследование («неживая» свиная почка)

С целью первичной оценки размеров ледяного шара после выполнения криоабляции при помощи криоустановки ErbeCryo 2, а также определения функциональных характеристик гибкого криозонда диаметром 2,4мм компании ErbeElectromedizin были проведены экспериментальные исследования in vitro.

При планировании нашего экспериментального исследования мы учитывали данные ранее проведенных экспериментов в этом направлении.

Учитывая отсутствие данных в доступной литературе об использовании углекислого газа в качестве хладагента при криоабляции, а также влияния низких температур углекислого газа на ткань почки, первоочередно в экспериментах in vitro мы стремились оценить размер ледяного шара после выполнения криоабляции при помощи криоустановки ErbeCryo 2, а также определить функциональные характеристики гибкого криозонда диаметром 2,4мм компании Erbe Electromedizin. По завершению эксперимента патоморфологическое исследование не выполнялось, так как на основе вышеизложенных данных, проведение криоабляции на органе в зависимости от кровоснабжения приводит к различным температурным показателям и диаметру некроза. В связи с чем эксперименты in vitro не позволяют оценить характер замораживания in vivo.

Для первичной оценки и определения влияния низких температур углекислого газа в качестве материала для эксперимента нами была взята «неживая» свиная почка, так как удельная теплоемкость тканей почки (3,89 кДж/кг/°К) и предстательной железы (3,80 кДж/кг/°К) почти эквивалентны, что делает свиную почку подходящей моделью для проведения экспериментальных исследований. Свиная почка была зафиксирована между двумя листами оргстекла (Рисунок 11). Толщина ткани свиной почки составляла 5 мм. Каждое оргстекло имело размеры 100x200мм и толщину 5мм.

После проверки всех технических характеристик и исправности оборудования при помощи пункционной иглы осуществлялся прокол свиной почки вглубь материала на 2-3см. После прокола внутренний стилет иглы удалялся. По внутреннему ходу иглы проводился криозонд, после чего выполнялась криоабляция.

Для определения максимального размера ледяного шара при использовании гибкого криозонда диаметром 2,4мм нами было выполнено 50 криозаморозок. По итогу максимальный диаметр ледяного шара $10\text{мм} \pm 2\text{мм}$ достигался с использованием гибкого криозонда диаметром 2,4мм при 120 секундах криоэкспозиции. При проведении криозаморозки дольше 120 секунд диаметр ледяного шара визуально не увеличивался. Время оттаивания в среднем составляло $80 \pm 2\text{сек}$. Ниже показано сравнение режимов криоэкспозиции в 90 и 120 секунд криозондом диаметром 2,4 мм (Рисунок 12-13). При данных сравнениях отмечена прямая взаимосвязь между диаметром ледяного шара и временем криозаморозки.

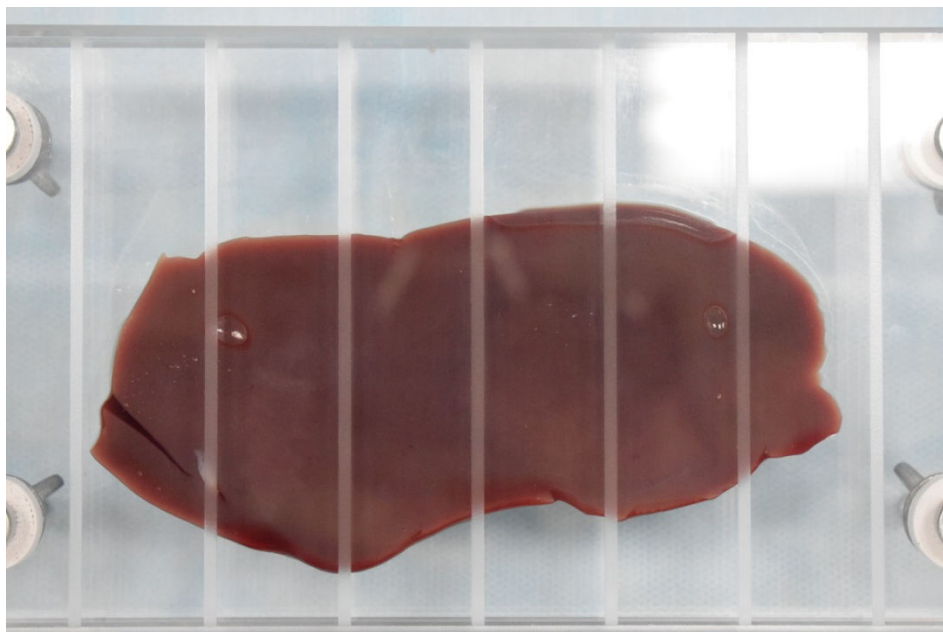


Рисунок 11 – Свиная почка, фиксированная между двумя листами оргстекла

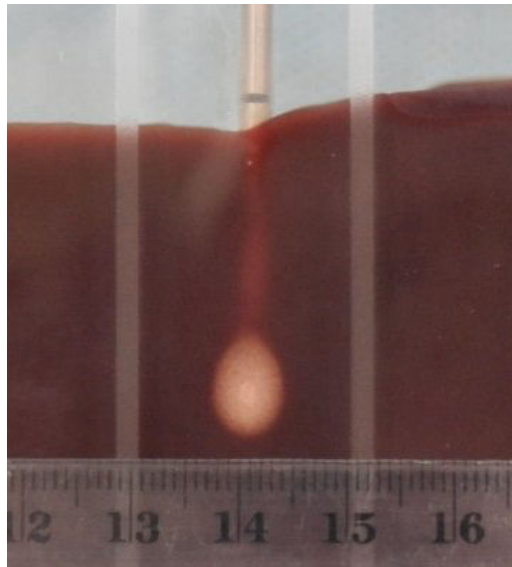


Рисунок 12 – Кριοэкспозиция 90 секунд криозондом диаметром 2,4 мм

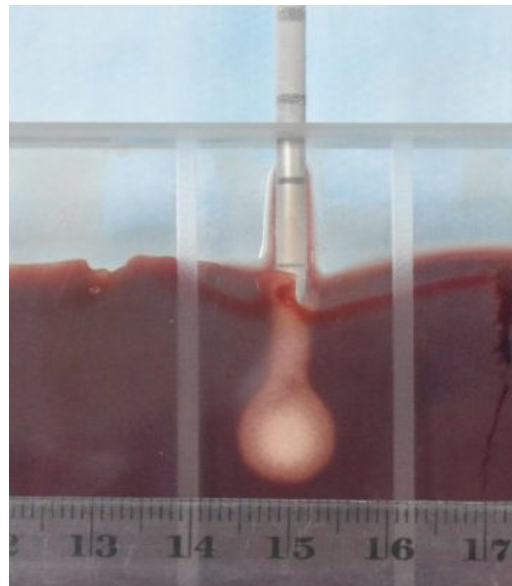


Рисунок 13 – Кριοэкспозиция 120 секунд криозондом диаметром 2,4 мм

3.2 In vivo экспериментальное исследование («живая» свиная почка)

Данный эксперимент *in vivo* был направлен на оценку влияния низкотемпературного воздействия CO₂ на ткани живой кровоснабжаемой свиной почки, что позволит определить возможность и целесообразность карбоксикриоабляции, а также эмпирически установить режимы криовоздействия [13].

При проведении наших экспериментов мы основывались на предыдущих экспериментальных исследованиях в области криоабляции свиной почки.

При проведении нашего эксперимента для криоабляции на основе углекислого газа мы использовали самок свиноматки линии мини-пиг [13]. Средний вес животных составлял 35-40 кг, а возраст 5-6 месяцев. Лапароскопическая карбоксикриоабляция тканей живой почки выполнялась с помощью криохирургической установки ErbeCryo 2 и гибкого зонда диаметром 2,4 мм (Erbe Electromedizin, Германия) [13].

Перед проведением экспериментальной карбоксикриоабляции животное не кормили. Была выполнена премедикация и седация (атропин 0,05 мг/кг, зоветин 10 мг/кг, ксилазин 0,2 мг/кг – внутримышечное введение), канюлирование ушной вены, интубация животного. Анестезиологическое пособие: пропофол 5 мг/кг внутривенно, веро-пипекуроний 0,02 мг/кг внутривенно, аэран 1,3–3,0% с кислородом ингаляционно [13].

С использованием иглы Вереща, установленной в окологруничное пространство, был наложен пневмоперитонеум (давление 12 мм рт.ст.) Далее устанавливался 12 мм троакары и производилось перемещение животного в боковое положение. Два дополнительных троакара диаметром 5 мм были установлены латеральнее прямой мышцы живота, а также проксимальнее и дистальнее пупка. По ним последовательно проводилась 3 мм игла эндоскопическая пунктирующая (ИЭП) (Рисунок 14). Пункция почки производилась в 3-х сегментах (нижний, средний, верхний) на глубину 2 см. В дальнейшем просвет ИЭП использовался для доставки гибкого криозонда к паренхиме почки (Рисунок 15) [13].

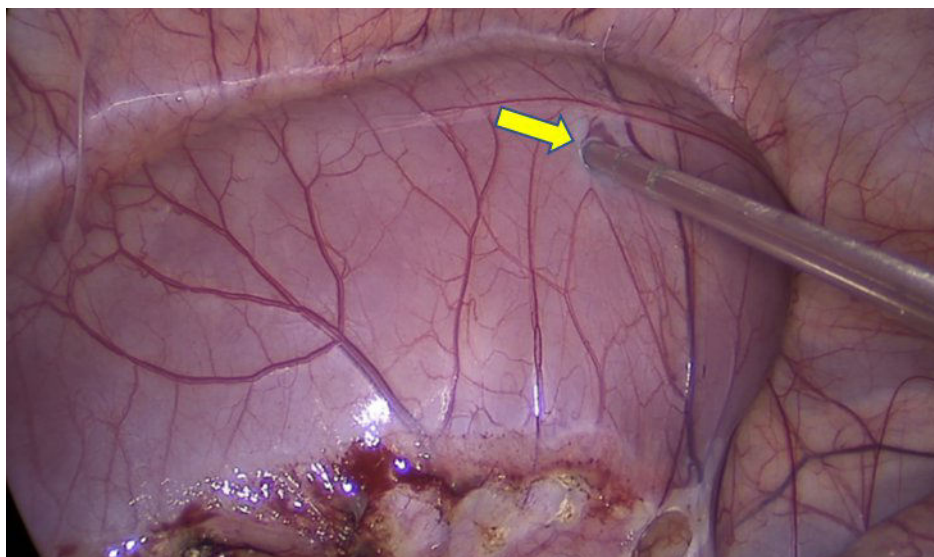


Рисунок 14 – Пункция нижнего сегмента почки при помощи иглы эндоскопической пунктирующей (указано стрелкой)

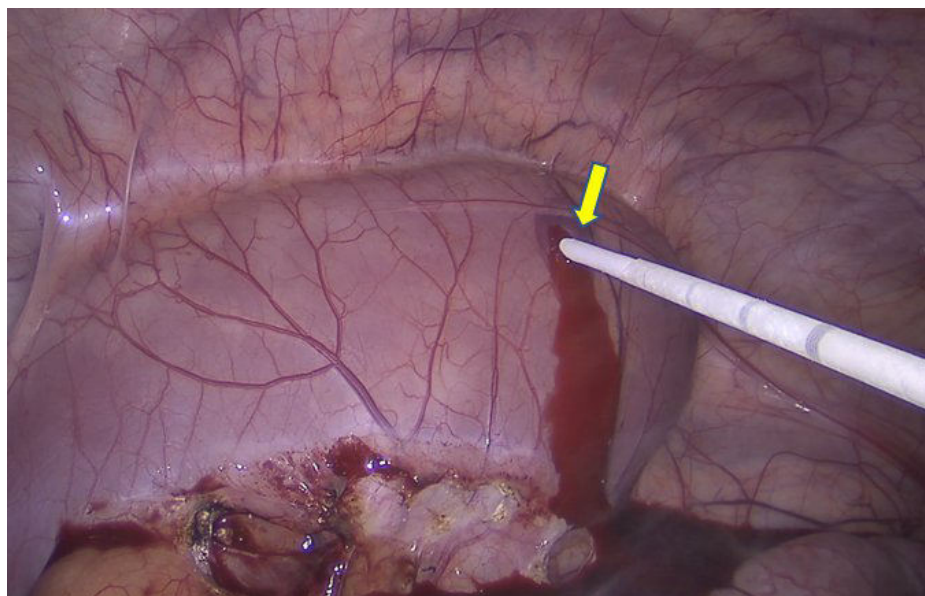
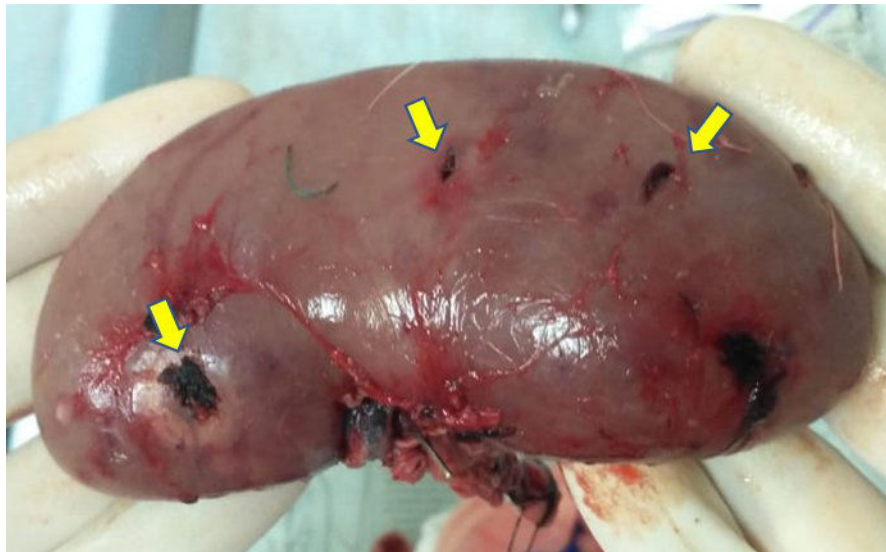


Рисунок 15 – Проведение гибкого криозонда по просвету иглы с последующей криоабляцией

Карбоксикриоабляция была выполнена в нижнем, среднем и верхнем сегментах почки. Продолжительность низкотемпературного воздействия (криоабляции) в среднем и верхнем сегментах составляло 90 и 60 сек соответственно, а время оттаивания кончика криозонда - 70 и 60 сек [13]. Следующим этапом через разрез по средней линии производилась нефрэктомия и извлечение почки с дальнейшим направлением на гистологическое исследование

(Рисунок 16) [13]. Эксперимент завершался путем введения животному лекарственных средств, останавливающих сердечную деятельность [13].



Примечание: Стрелками указаны точки ввода криозонда

Рисунок 16 – Удаленная свиная почка после выполненной процедуры карбоксикриоабляции

Согласно результатам проведенного патоморфологического исследования удаленной свиной почки после выполненной процедуры карбоксикриоабляции (Рисунок 17-19) были получены следующие данные: все зоны вокруг точек введения криозонда представлены массивными кровоизлияниями (скопления эритроцитов) [13]. Ткани почечной паренхимы, располагающиеся по периферии точек введения зонда, подверглись необратимой деструкции – некрозу [13]. Гистологически зоны некроза представлены почечными клубочками и канальцами с явлениями кариопикноза и кариолизиса – клеточные ядра либо определяются как уменьшенные в размерах и сморщенные, либо отсутствуют [13].



Примечание: некроз почечной паренхимы представлен участком неправильной формы темно-коричневого цвета. Глубина некроза до 1 см от точки введения криозонда

Рисунок 17 – Участок паренхимы почки после карбоксикриоабляции №1. Режим экспозиции – 120 сек



Примечание: некроз почечной паренхимы представлен участком неправильной формы темно-коричневого цвета. Глубина некроза до 0,8 см от точки введения криозонда

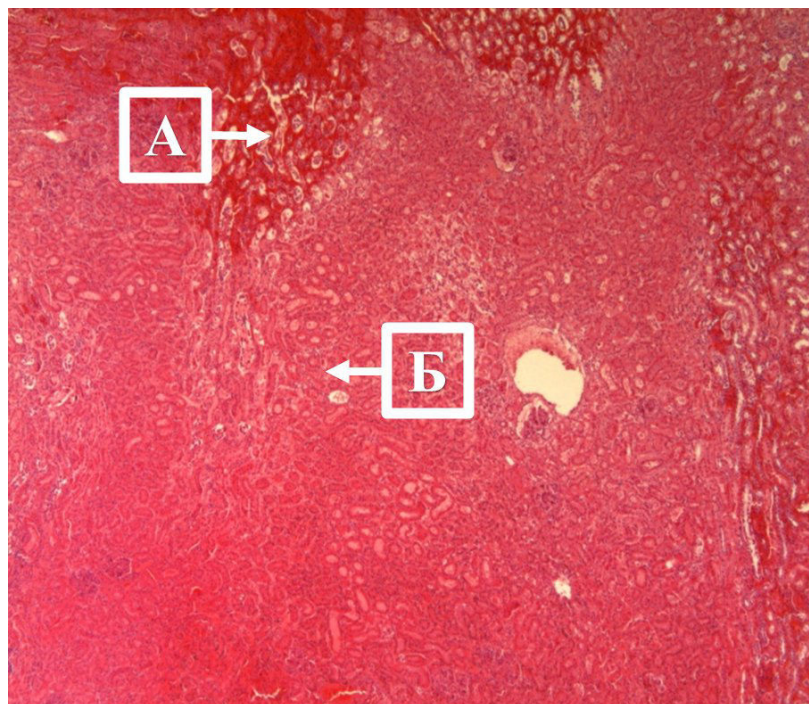
Рисунок 18 – Участок паренхимы почки после карбоксикриоабляции №2. Режим экспозиции – 90 сек



Примечание: некроз почечной паренхимы представлен участком неправильной формы темно-коричневого цвета, толщиной до 0,2 см. Глубина некроза до 0,5 см от точки введения криозонда

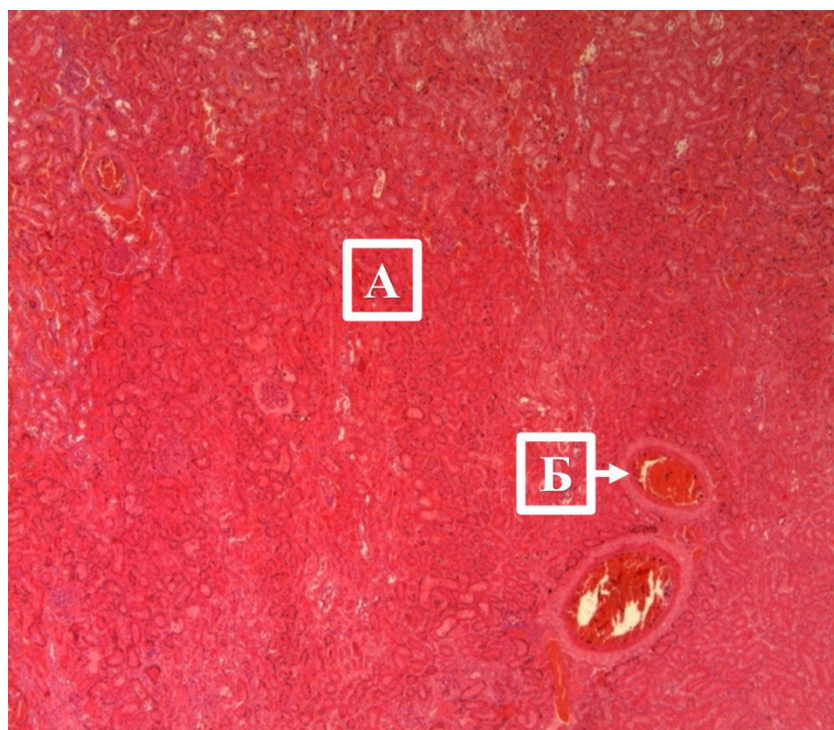
Рисунок 19 – Участок паренхимы почки после карбоксикриоабляции №3. Режим экспозиции – 60 сек

На всех участках паренхимы почки, подвергшихся карбоксикриоабляции, зона необратимой деструкции – некроза распространялась на 0,5 см от точек введения криозонда. Имеет место четкая демаркационная линия и воспаление, представленное фокусными кровоизлияниями и расширенными полнокровными сосудами, которое окружает зону деструкции (Рисунок 20-21) [13].



Примечание: Микрофотография с увеличением X50. Окрашивание гематоксилином и эозином. А – массивные кровоизлияния в точке введения криозонда. Б – зона некроза паренхимы почки на расстоянии 0,2 см от точки введения зонда

Рисунок 20 – Микрофотография паренхимы свиной почки. Участок в точке введения криозонда

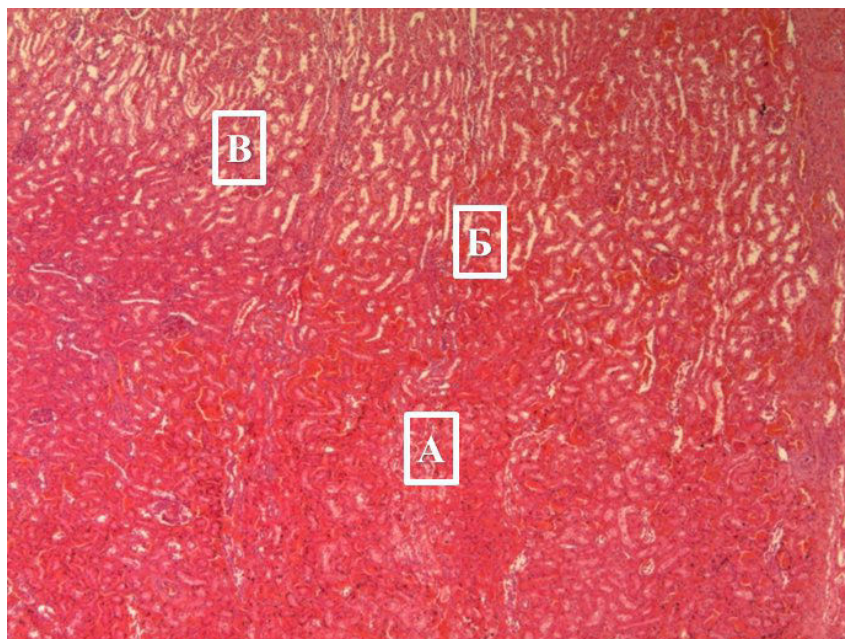


Примечание: Микрофотография с увеличением X50. Окрашивание гематоксилином и эозином. А – массивная зона некроза. Б – расширенные полнокровные сосуды

Рисунок 21 – Микрофотография паренхимы свиной почки. Участок на расстоянии 0,2 см от точки введения криозонда

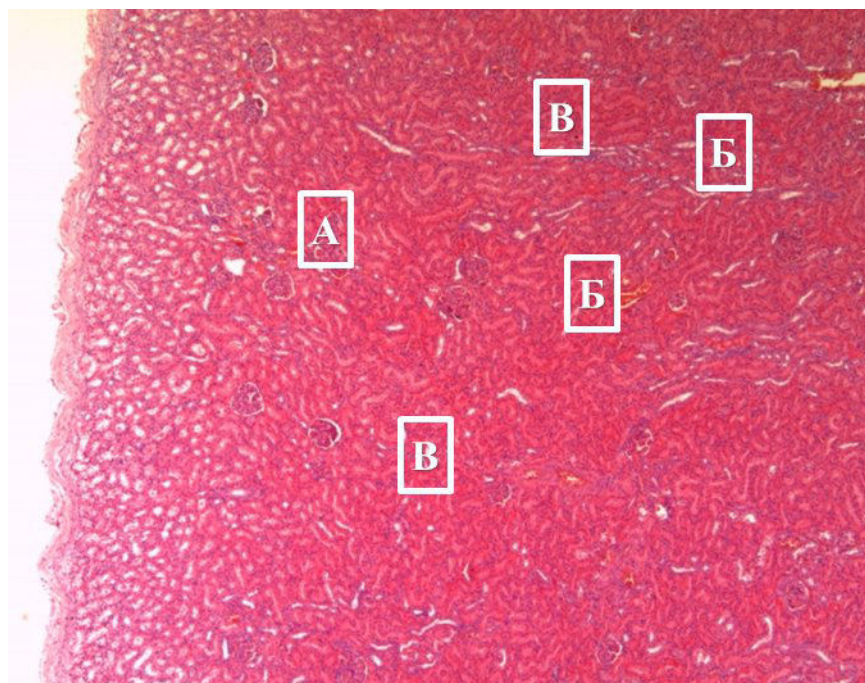
При гистологическом исследовании паренхимы свиной почки в зоне демаркационного воспаления отмечаются признаки гиалиново-капельной и гидропической белковой дистрофии эпителиальных клеток почечных канальцев (Рисунок 22-23). При этом выраженной лейкоцитарной инфильтрации (полиморфноядерной), характерной для различных форм некроза, в данном случае не наблюдается. При более детальном анализе отмечается наличие единичных лейкоцитов в зоне воспаления. Белковая дистрофия эпителиальных клеток в сочетании с очаговой лимфо-макрофагальной инфильтрацией сохраняется на расстоянии 10 и 15 мм от точек введения криозонда. Эпителий почечной лоханки в некоторых зонах гиперплазирован, а также присутствует инфильтрация лимфо-макрофагальными элементами с единичными лимфоидными фолликулами. Признаки кровоизлияний и/или некротических изменений отсутствуют [13].

По результатам проведенной карбоксикриоабляции паренхимы свиной почки максимальная площадь некроза имела место при режиме криовоздействия продолжительностью 120 сек в нижнем сегменте (участок №1). При этом зона необратимой деструкции распространяется на глубину от 0,4 до 0,5 см от точки входа криозонда. Зона некроза глубиной 0,2 см представлена на всех участках паренхимы почки, подвергшихся карбоксикриоабляции.



Примечание: Микрофотография с увеличением X50. Окрашивание гематоксилином и эозином. А – зона некроза, представленная канальцами с явлениями кариолизиса (ядра отсутствуют). Б – демаркационное воспаление, представленное кровоизлияниями и отдельными полнокровными сосудами. В – сохранная паренхима почки с отдельными клубочками и канальцами, эпителий с признаками белковой дистрофии

Рисунок 22 – Микрофотография паренхимы свиной почки. Участок на расстоянии 0,5 см от точки введения криозонда



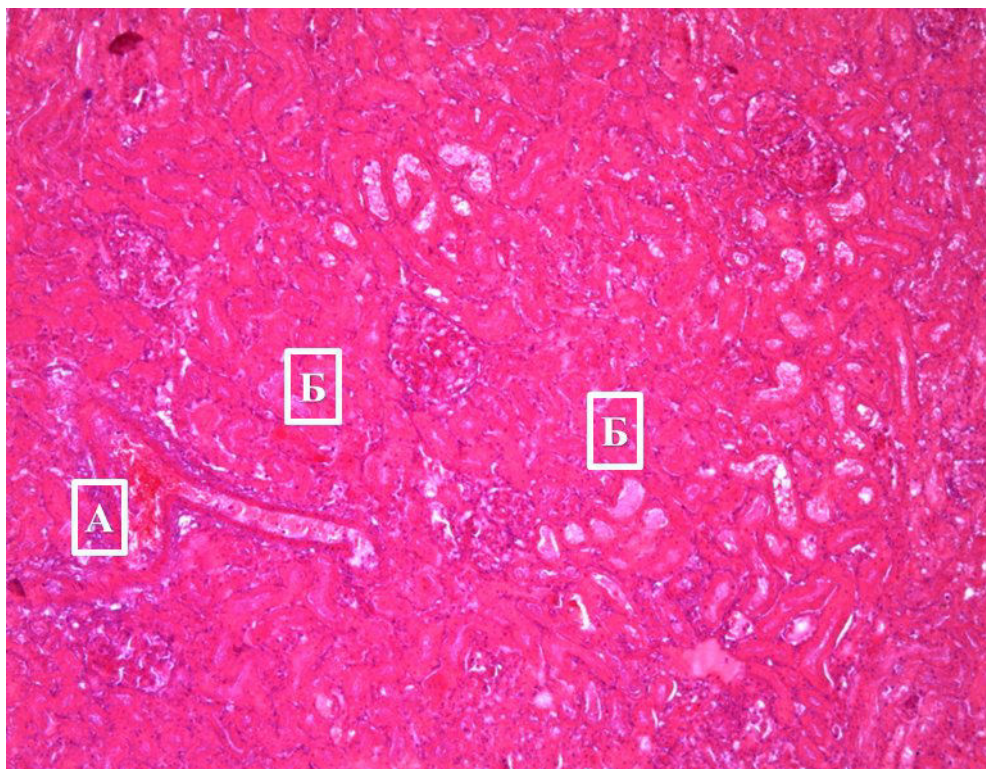
Примечание: Микрофотография с увеличением X50. Окрашивание гематоксилином и эозином. А – сохраненные клубочки. Б – тонкостенные полнокровные сосуды. В – эпителий канальцев с признаками выраженной белковой (гиалиново-капельной) дистрофией

Рисунок 23 – Микрофотография паренхимы свиной почки. Участок на расстоянии 1 см от точки введения криозонда

Для сбора статистически значимых данных эксперимент был проведен еще 4 раза. Однако, после проведения первичного эксперимента мы ограничились криоабляцией одинарным циклом с режимом криоэкспозиции в 120 секунд верхнего и нижнего сегментов. Было выполнено 8 одинарных циклов криоабляции верхнего и нижнего сегментов на 4 свиных почки 4 самок свиней.

При патоморфологическом исследовании в каждом препарате определялись 8 фокусов округлой формы, диаметром от 0,4 до 1,0 см, темно-красного цвета. На разрезе, в паренхиме представленных препаратов, в участках проникновения зонда, определялись фокусы темно-красного цвета, дряблой консистенции, распространяющиеся на глубину от 0,5 до 1,0 см, преимущественно треугольной формы.

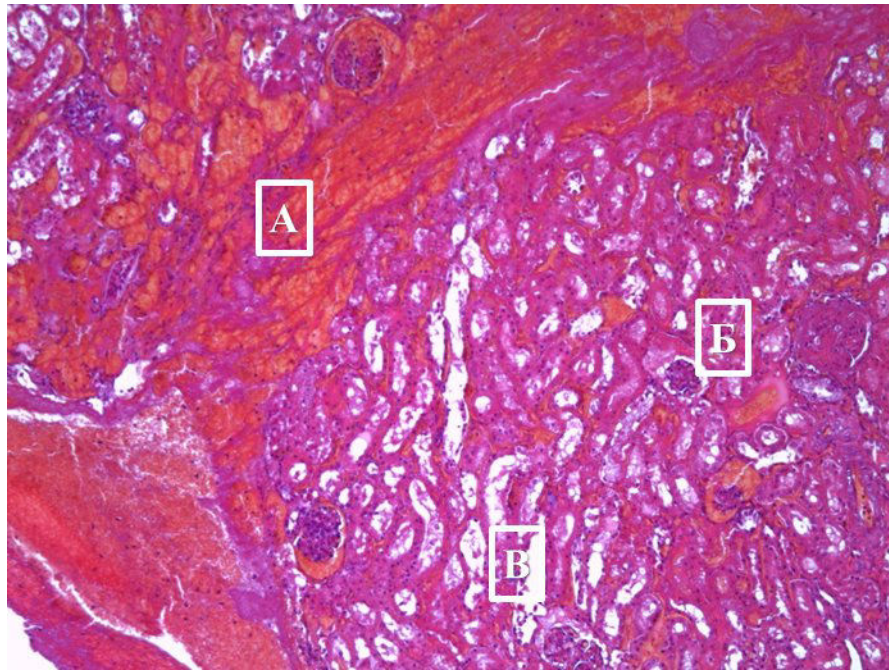
В зонах введения криозонда, во всех препаратах, определялись кровоизлияния, проникающие в толщу паренхимы почек (максимально на глубину 1,0 см). Участки кровоизлияний и, прилегающая к ним ткань, с диффузной, рассеянной инфильтрацией полиморфноядерными лейкоцитами. Вокруг фокусов внедрения криозонда определялся некроз паренхимы (на расстоянии приблизительно до 0,5 см). Зона необратимой деструкции – некроза – при гистологическом исследовании представлена почечными клубочками и канальцами с явлениями кариолизиса (отсутствия клеточных ядер), кариорексиса (фрагментация клеточного ядра), плазморексиса (фрагментация цитоплазмы клетки), явлениями незначительной инфильтрации лейкоцитами. Кровеносные сосуды в зоне некроза расширены и полнокровны [13]. На одном из участков почечной ткани на незначительном расстоянии от точки входа криозонда отмечаются признаки массивного подкапсульного кровоизлияния протяженностью до 4,0 см [13].



Примечание: Микрофотография с увеличением X200. Окрашивание гематоксилином и эозином. А – расширенные полнокровные сосуды в зоне некроза. Б – тотальный некроз на расстоянии 0,5 см от точки входа криозонда

Рисунок 24 – Микрофотография паренхимы свиной почки. Участок на расстоянии 0,5 см от точки введения криозонда

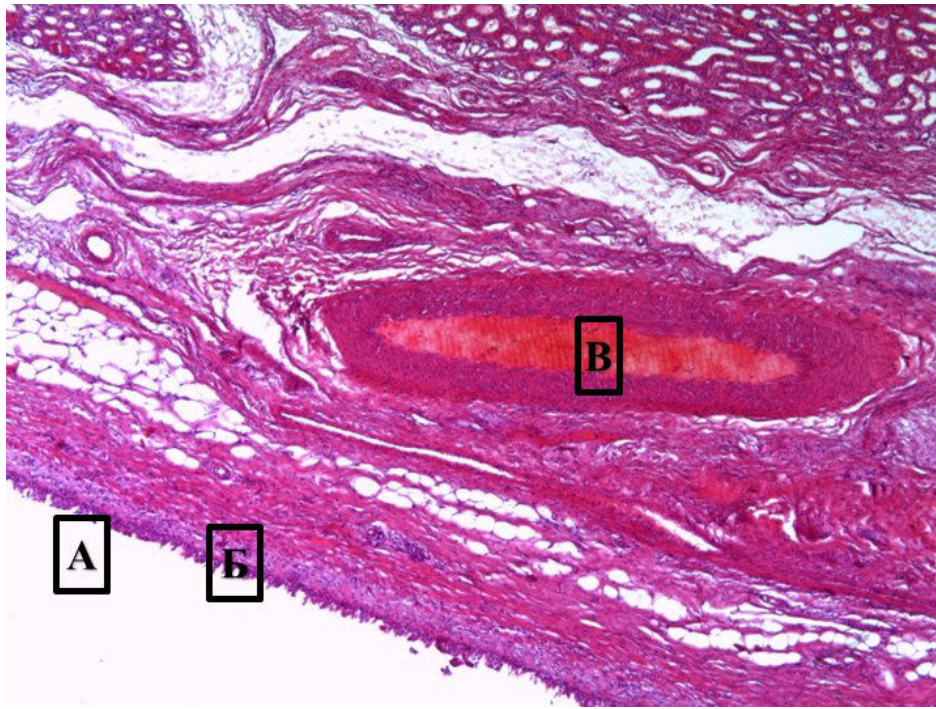
Большинство клубочков в почечной паренхиме (в удаленной от участков внедрения зонда паренхиме) сохранены, однако в части клубочков отмечалось кровоизлияние в капсуле Шумлянского-Боумана. Эпителиальные клетки почечных канальцев при гистологическом исследовании всех препаратов отличаются признаками выраженной белковой дистрофии [13].



Примечание: Микрофотография с увеличением X200. Окрашивание гематоксилином и эозином. А – признаки кровоизлияния в точке введения криозонда. Б – сохранные клубочки с кровоизлияниями в капсуле Шумлянско-Боумана. В – эпителиальные клетки канальцев с явлениями белковой дистрофии и некроза отдельных эпителиоцитов

Рисунок 25 – Микрофотография паренхимы свиной почки. Участок в точке введения криозонда

Переходный эпителий, выстилающий лоханку, местами слущен. Стенка лоханки с очаговой невыраженной лимфоидной инфильтрацией и единичными расширенными полнокровными сосудами.



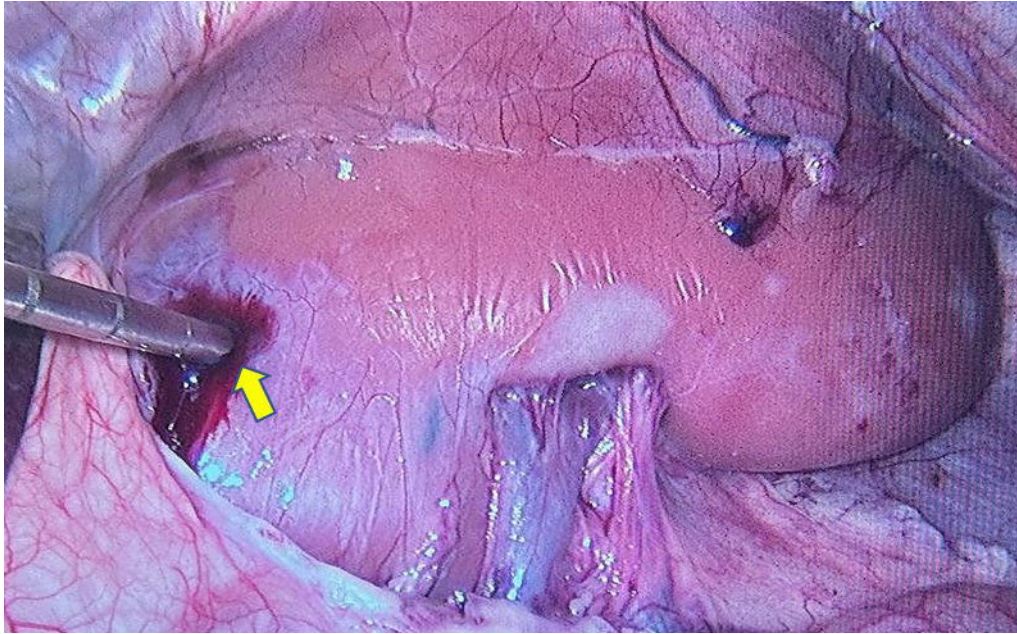
Примечание: Микрофотография с увеличением X200. Окрашивание гематоксилином и эозином. А – переходный эпителий лоханки. Б – невыраженная лимфоцитарная инфильтрация в стенке лоханки. В – резко расширенные полнокровные сосуды в стенке лоханки.

Рисунок 26 – Микрофотограмма свиной почки

По результату всех девяти экспериментальных исследований при выполнении карбоксикриоабляции свиной почки одинарным циклом с режимом криоэкспозиции в 120 секунд зона некроза достигала 5мм вокруг места введения криозонда общим диаметром 10мм.

Учитывая литературные данные об эффективности двойного цикла замораживания при криоабляции, а также с целью определения максимальных возможностей оборудования ErbeCryo2 и низких температур углекислого газа при карбоксикриоабляции ткани почки, были проведены дополнительные эксперименты с двойным циклом замораживания и увеличенным временем криоэкспозиции.

Криоабляция выполнялась с режимами криоэкспозиции в 120 и 240 секунд двойным циклом замораживания и одним циклом оттаивания верхнего и нижнего сегментов свиной почки. Всего было выполнено четыре эксперимента данного рода на 4-ех почках 4-ех свиней.



Примечание: место пункции указано стрелкой

Рисунок 27 – Пункция верхнего сегмента почки при помощи иглы эндоскопической пунктирующей

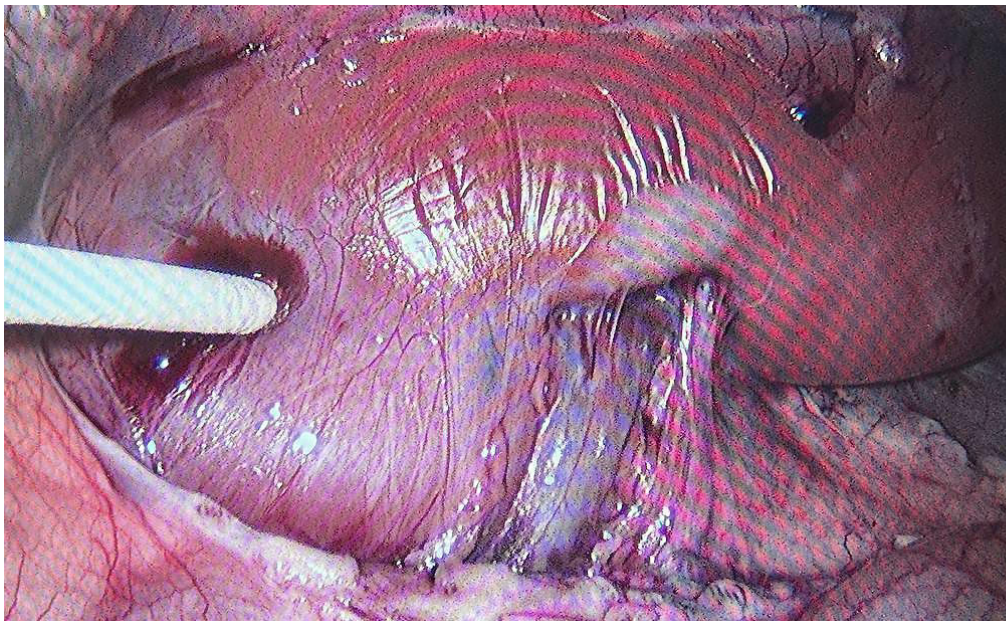


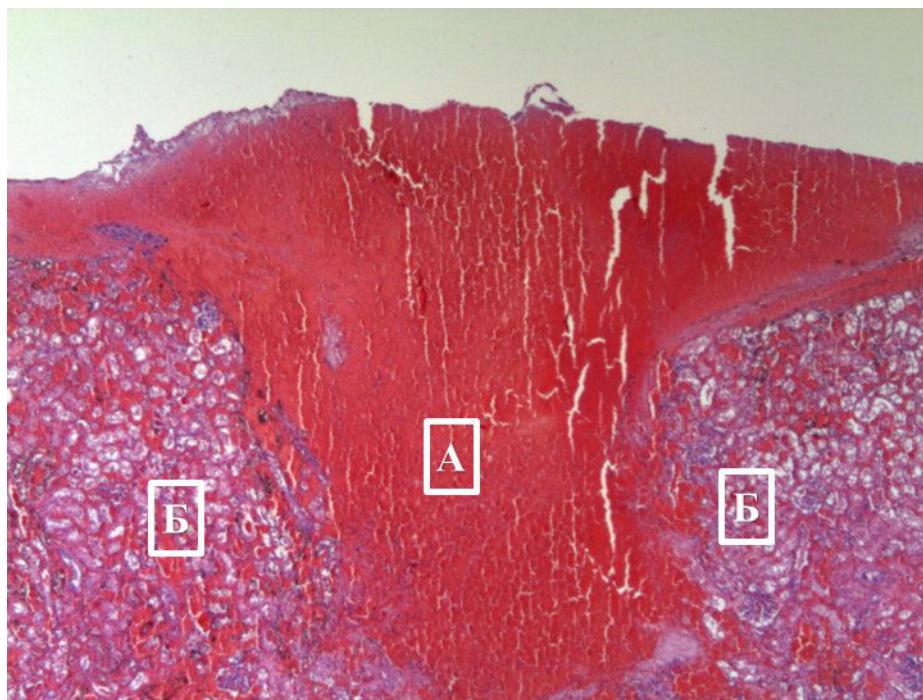
Рисунок 28 – Проведение гибкого криозонда по просвету иглы с последующей криоабляцией с двойным циклом



Примечание: стрелками указаны места введения криозонда

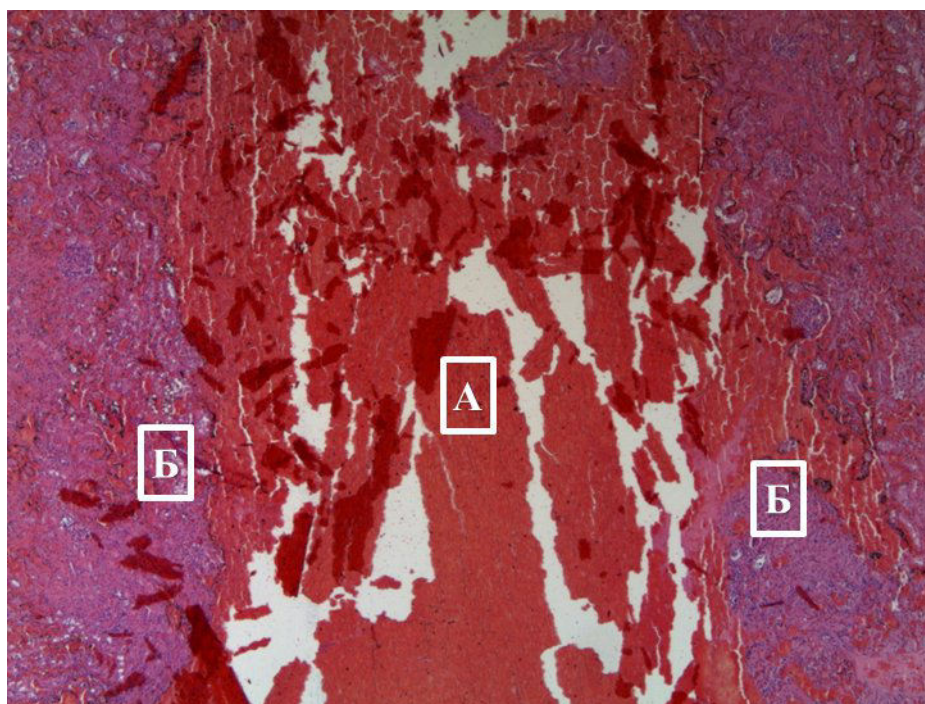
Рисунок 29 – Удаленная свиная почка

При патоморфологическом исследовании во всех восьми участках криоабляции зона проникновения криозонда представлена кровоизлиянием, максимальной шириной 2 мм, распространяющимся на 7-8 мм до мышечной оболочки стенки лоханки. К кровоизлиянию прилегал участок, в котором (в радиусе 5 мм) изменения в ткани почки представлены некрозом эпителиоцитов почечных канальцев с участками скопления макрофагов, в цитоплазме которых пигмент гемосидерин. Во всех участках введения криозонда зона некроза достигала 5мм вокруг места введения криозонда общим диаметром 1 см.



Примечание: Микрофотография с увеличением X50. Окрашивание гематоксилином и эозином. А – кровоизлияние в точке введения криозонда. Б – тотальный некроз паренхимы почки

Рисунок 30 – Микрофотография паренхимы свиной почки. Участок в точке введения криозонда



Примечание: Микрофотография с увеличением X50. Окрашивание гематоксилином и эозином. А – кровоизлияние в точке введения криозонда. Б – тотальный некроз паренхимы почки

Рисунок 31 – Микрофотография паренхимы свиной почки. Участок в точке введения криозонда

В результате всех *in vivo* экспериментальных исследований на свиной почке было установлено, что применение локального низкотемпературного воздействия с использованием CO₂ (карбоксикриоабляции) сопряжено с необратимой деструкцией и гибелью пораженной паренхимы почки. Глубина зоны некроза напрямую зависит от выбранного режима криовоздействия. Установлено, что максимальная протяженность зоны некроза, которая составила 10 мм в диаметре, достигается при режиме экспозиции в 120 сек. При этом увеличение продолжительности воздействия до 240 сек, а также сравнительное использование одинарного и/или двойного цикла замораживания тканей не приводили к изменению диаметра некротической зоны [13].

Зона деструкции и гибели паренхимы почки при разных режимах криовоздействия (120 и 240 сек) и возможного повторения циклов криоабляции оставалась неизменной и составляла 10 мм в диаметре [13].

Таким образом, карбоксикриоабляция является доступной и выполнимой хирургической процедурой и позволяет проводить девитализацию почечной ткани диаметром 10 мм [13].

3.3 *In vitro* экспериментальное исследование (удаленная предстательная железа)

Данный эксперимент *in vitro* был направлен на оценку влияния низкотемпературного воздействия CO₂ на ткани человеческой предстательной железы, что позволило определить возможность и целесообразность карбоксикриоабляции, а также эмпирически установить режимы криовоздействия [13, 14].

В качестве материала мы использовали удаленную предстательную железу после радикальной простатэктомии.

В данном экспериментальном исследовании использовалась удаленная предстательная железа (Рисунок 34) пациентов с верифицированным локализованным раком предстательной железы стадии T1-T2N0M0 (после

лапароскопической или робот-ассистированной радикальной простатвезикулэктомии). Всего данного рода экспериментов было выполнено 3. Обязательным условием проведения экспериментального исследования было наличие письменного согласия пациентов на участие в исследовании.

Исходно пациенту Г. 57 лет по поводу впервые выявленного в жизни повышения уровня ПСАобщ до 9 нг/мл выполнено МРТ ОМТ с в/в контрастированием (Рисунок 33): в периферической зоне предстательной железы определяется очаг, активно накапливающий контрастный препарат (Pi-RADS 4 балла), без экстракапсулярного распространения. Выполнена трансректальная биопсия предстательной железы под УЗ-контролем. Гистологическое заключение: ацинарная аденокарцинома 3+4=7 баллов по Глисону. Исходный объем предстательной железы по данным ультразвукового исследования составлял 53 см³ (Рисунок 32). По данным номограмм (POU, Briganti) вероятность поражения лимфатических узлов составляла 4%. Учитывая вышеперечисленное, а также с целью предотвращения прогрессирования онкологического процесса была выполнена лапароскопическая простатвезикулэктомия.

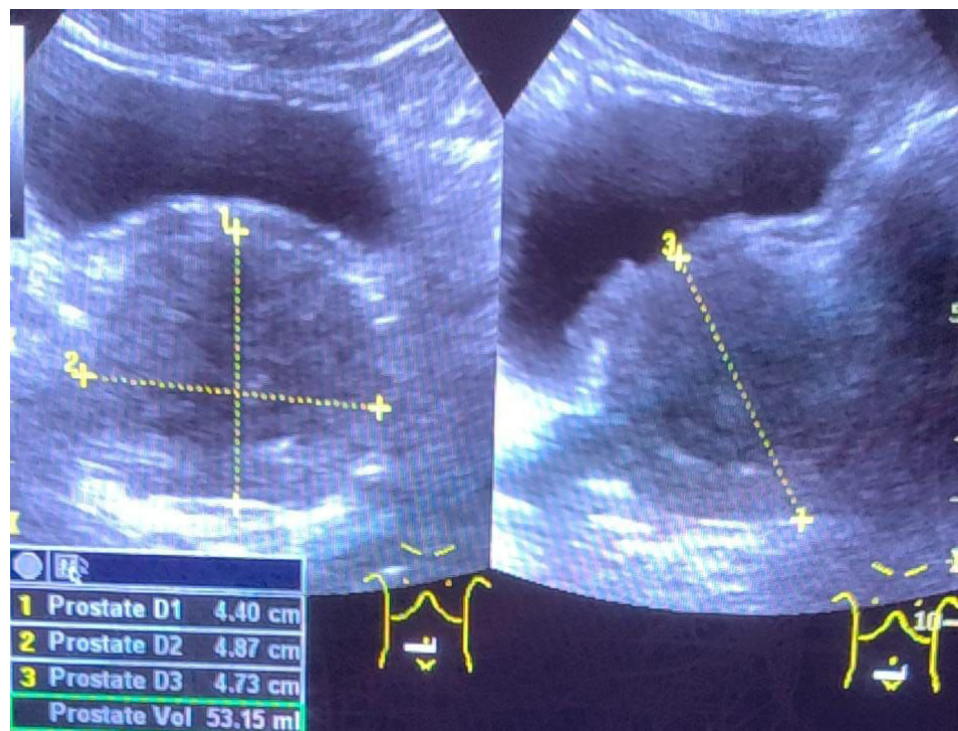


Рисунок 32 – Трансабдоминальное ультразвуковое исследование предстательной железы

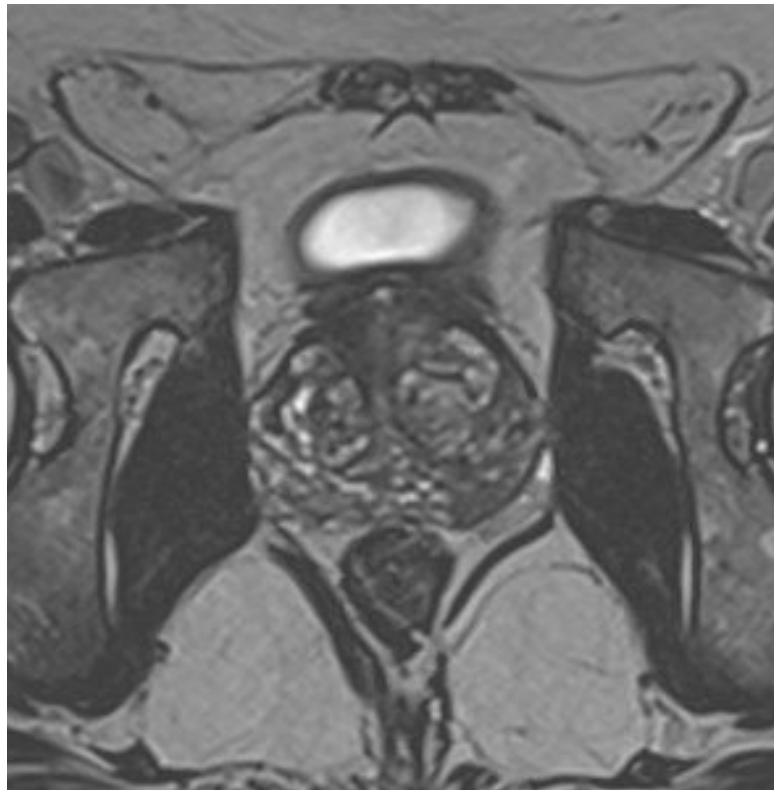


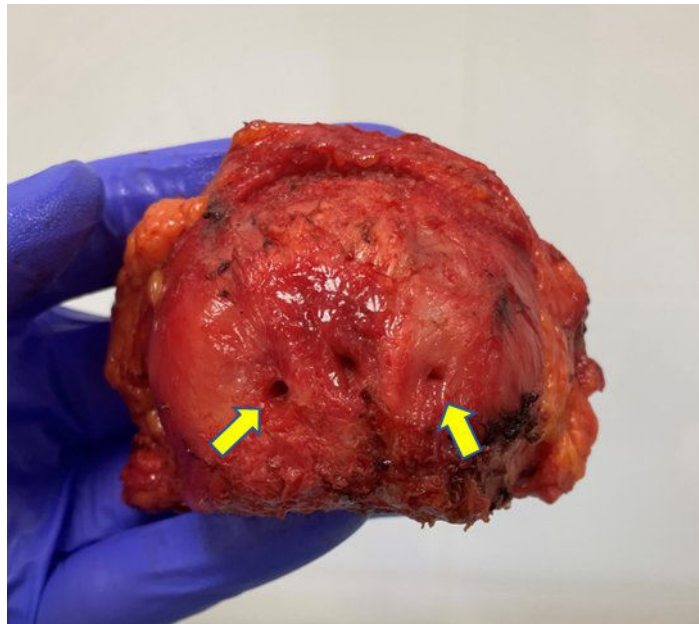
Рисунок 33 – Магнитно-резонансная томография предстательной железы



Рисунок 34 – Удаленная предстательная железа с семенными пузырьками

Криоабляция выполнялась криоустановкой ErbeCryo2 с помощью гибкого криозонда диаметром 2,4мм. При помощи пунктирующей иглы, отступя от простатического отдела уретры 15 мм влево и вправо, проводилась пункция левой доли простаты на глубину 2 см параллельно простатическому отделу

уретры и вдоль ее хода, затем аналогичная манипуляция проводилась и на правой доле простаты (Рисунок 35).



Примечание: стрелками указаны места введения криозонда

Рисунок 35 – Удаленная предстательная железа с семенными пузырьками

После пункции внутренний стилет иглы удалялся и по ее внутреннему каналу проводился криозонд с последующей криоабляцией экспозицией 120 секунд (Рисунок 36-37). По завершении эксперимента было выполнено патоморфологическое исследование удаленного органа.

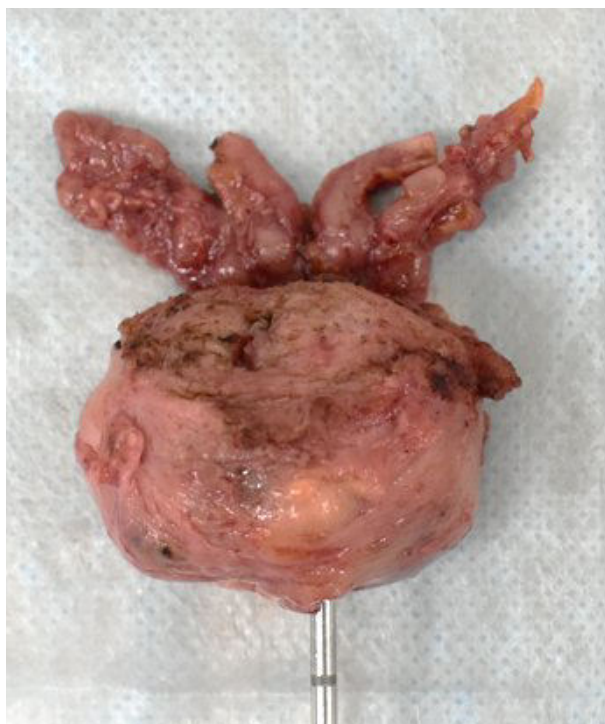


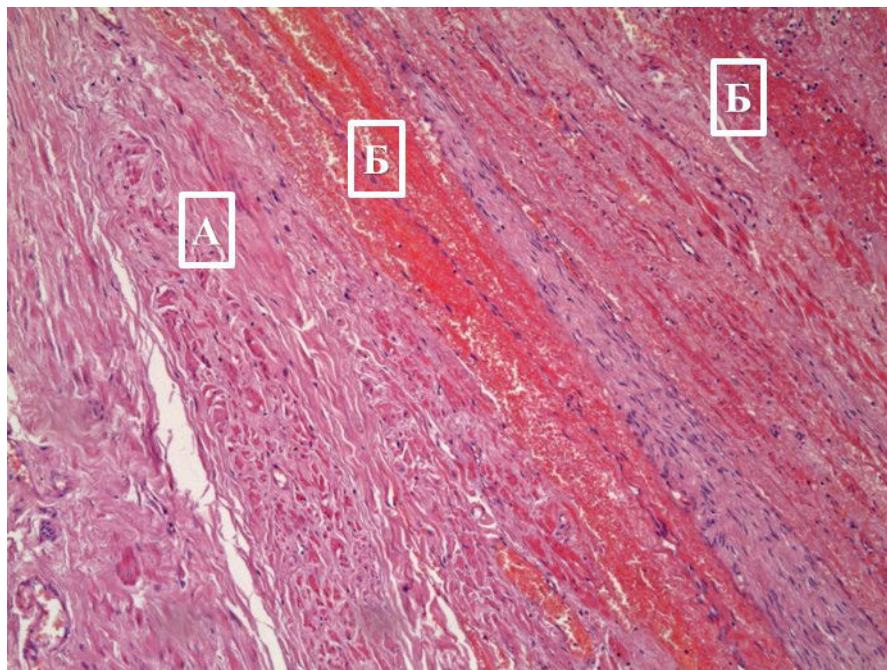
Рисунок 36 – Пункция левой доли предстательной железы с последующей криоабляцией



Рисунок 37 – Криоабляция левой доли предстательной железы

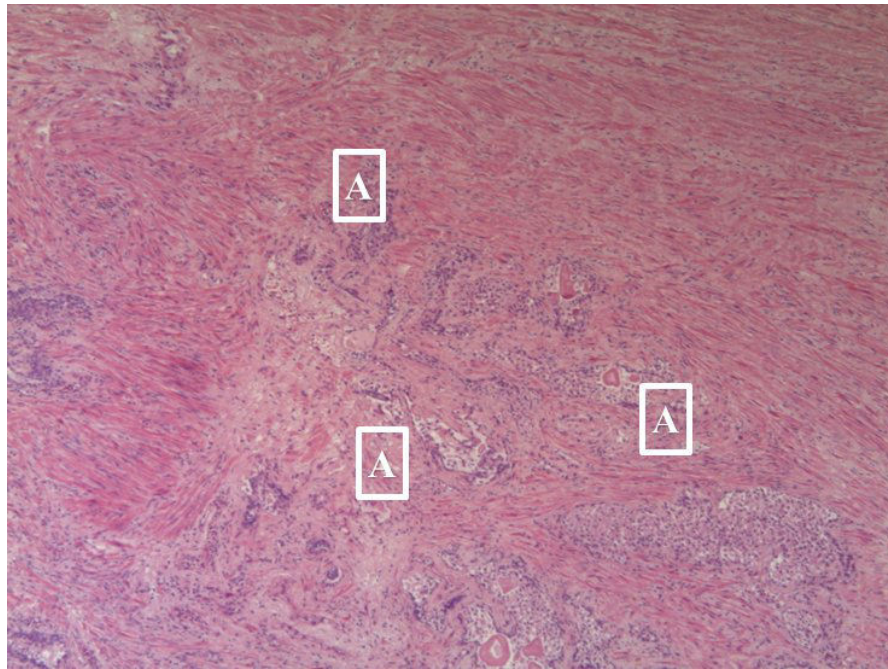
По данным патоморфологического исследования на расстоянии до 5 мм от места введения криозонда отмечались, как разрушенные железы, так и сохраненные,

эпителий желез на большом протяжении был разрушен, тотально слущен в просвет, отмечались отдельные железы с частично слущенным эпителием и сохранными железами. Строма рыхлая с признаками отека. Отчетливо определялись и фокусы роста ацинарной аденокарциномы, однако отмечались признаки просветления ядер опухолевых клеток и хорошо заметные ядрышки. В единичных опухолевых клетках определялись контуры ядер, вероятнее всего – начальные проявления кариолизиса, связанные с проведенной манипуляцией. Воспалительная инфильтрация стромы была скудной, представлена отдельными рассеянными лимфоцитами.



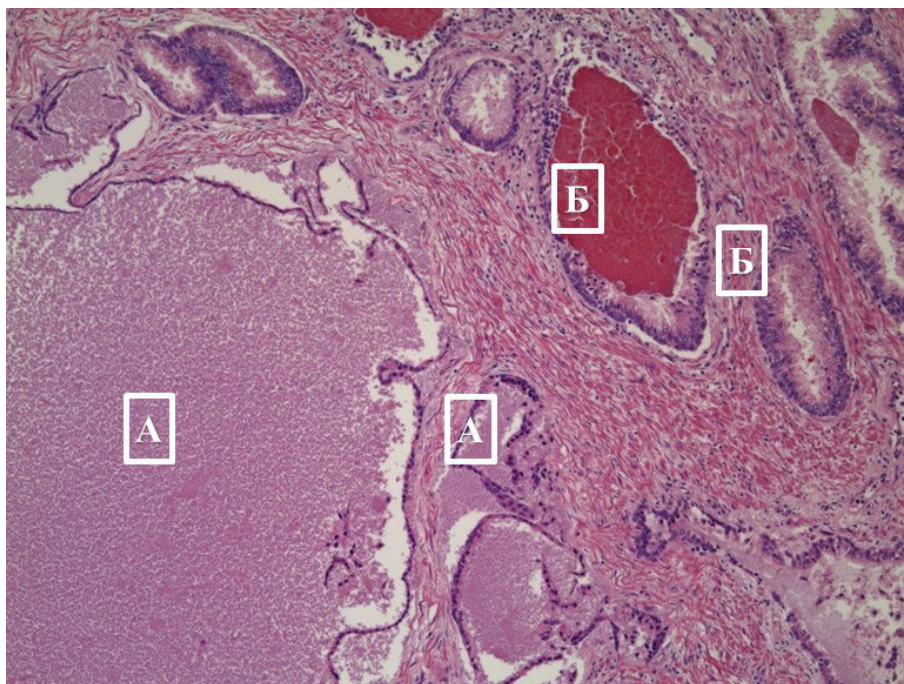
Примечание: Окраска гематоксилином и эозином, увеличение X100. А – фиброзно-мышечная строма предстательной железы. Б – очаговые, невыраженные кровоизлияния вблизи зоны проникновения криозонда

Рисунок 38 – Микрофотография предстательной железы. Участок ткани предстательной железы в точке входа криозонда



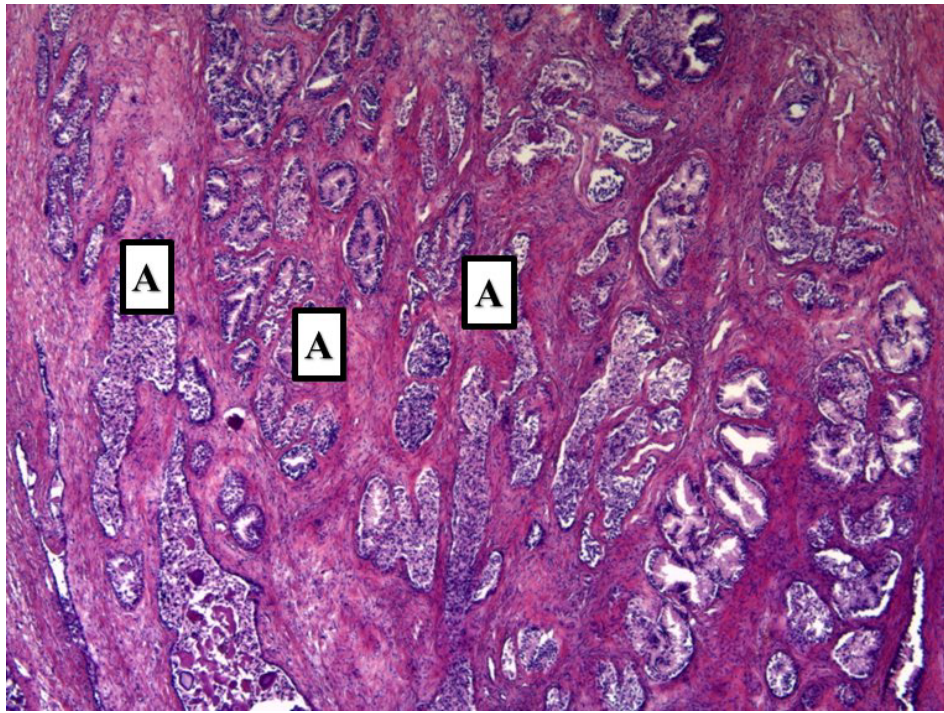
Примечание: Микрофотография с увеличением X50. Окрашивание гематоксилином и эозином. А – железы, подвергнувшиеся деструкции. Находятся рядом с участками кровоизлияний.

Рисунок 39 – Микрофотография предстательной железы. Участок ткани предстательной железы в точке входа кризонда



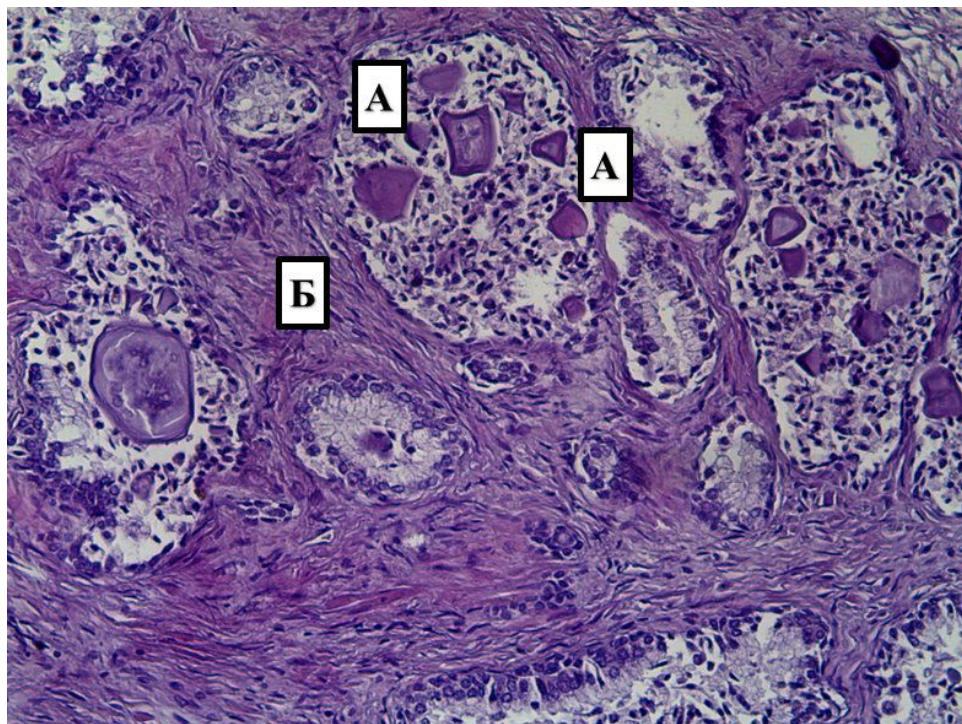
Примечание: Микрофотография с увеличением X100. Окрашивание гематоксилином и эозином. А – частично разрушенные железы, в просвете рыхлое, гомогенное эозинофильное содержимое. Эпителий частично слущен. Б – сохраненные железы простаты, в просвете части желез эритроциты

Рисунок 40 – Микрофотография предстательной железы. Участок ткани предстательной железы на расстоянии 0,5 см от точки входа кризонда



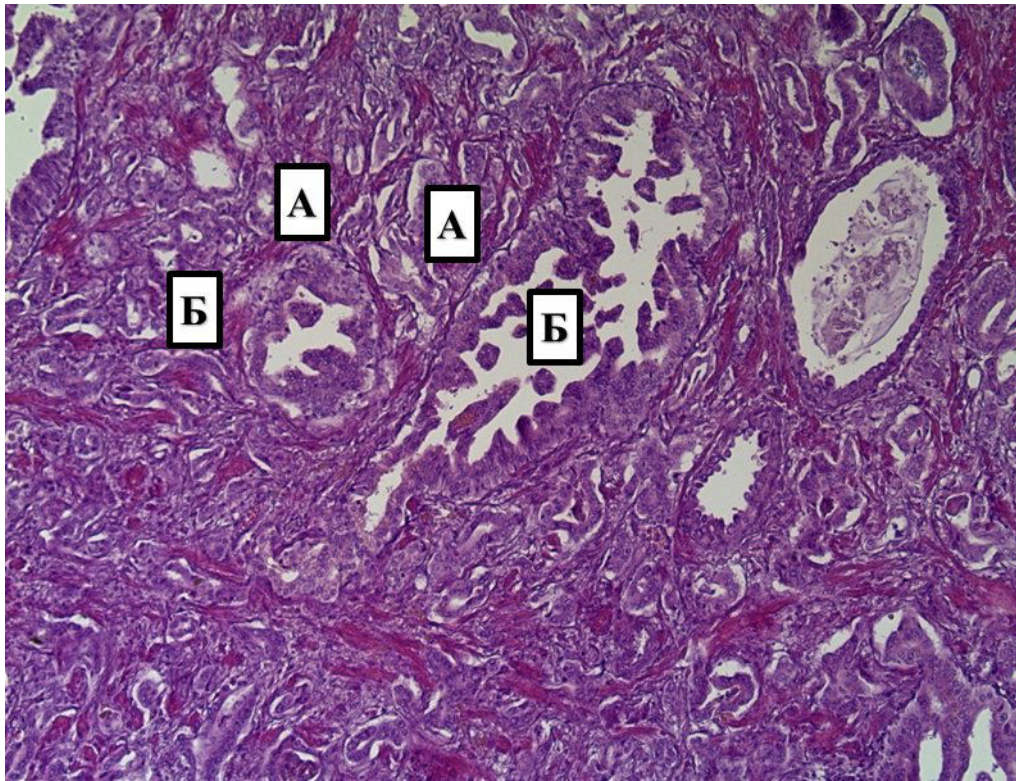
Примечание: Микрофотография с увеличением X50. Окрашивание гематоксилином и эозином. А – железы с разрушенным, тотально слущенным эпителием

Рисунок 41 – Микрофотография предстательной железы. Участок ткани предстательной железы в точке входа криозонда



Примечание: Микрофотография с увеличением X200. Окрашивание гематоксилином и эозином. А – эпителий желез местами тотально, местами частично разрушен и слущен в просвет. Б – единичные сохраненные железы

Рисунок 42 – Микрофотография предстательной железы. Участок ткани предстательной железы в точке входа криозонда



Примечание: Микрофотография с увеличением X100. Окрашивание гематоксилином и эозином. А – железисто-стромальная гиперплазия. Б – ацинарная аденокарцинома

Рисунок 43 – Микрофотография предстательной железы. Участок ткани предстательной железы на расстоянии 0,5 см от точки входа криозонда

Для определения температурных характеристик в зоне выполнения криоабляции и вблизи от нее нами использовались термодпары типа К.

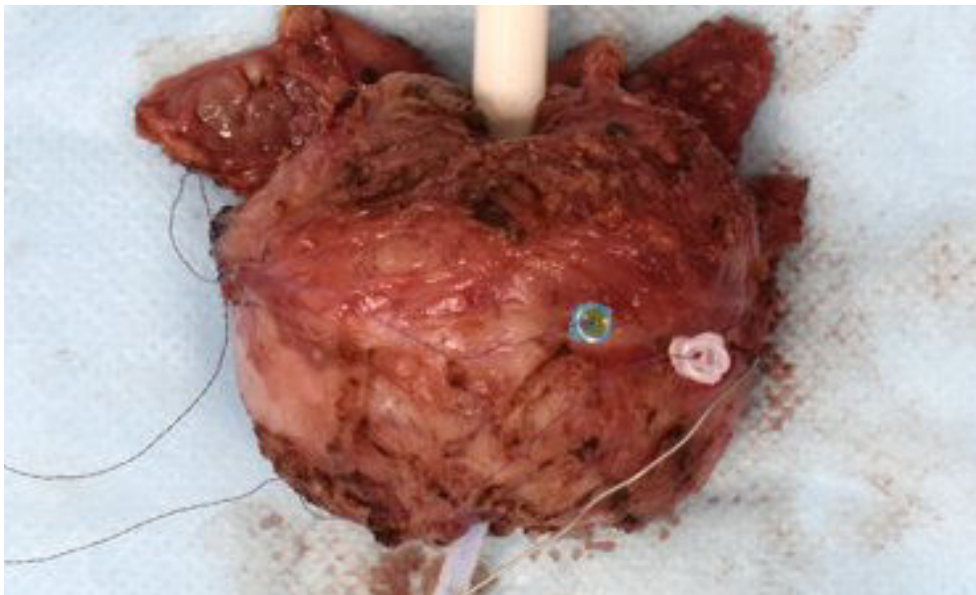


Рисунок 44 – Предстательная железа с установленными термодпарами

Термопары устанавливались непосредственно в зоне криоабляции, а также на расстоянии 0,5 и 1 см. Полученные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Исходная и минимальная температура в зависимости от близости к кончику криозонда

Локализация	Зона криоабляции	0,5 см от зоны криоабляции	1 см от зоны криоабляции
Исходная $t, ^\circ\text{C}$	23,4	23,8	24,2
Минимальная $t, ^\circ\text{C}$	-41,8	-40,1	23,42

В результате было выявлено, что при исходной температуре 23-24°C минимальная достигаемая температура в зоне криоабляции была минус 41,8°C, на расстоянии 0,5 см от зоны криоабляции минус 40,1 °C, а на расстоянии 1 см от зоны криоабляции температура практически оставалась неизменной.

По результату проведенных *in vitro* экспериментальных исследований карбоксикриоабляции одинарным циклом с режимом криоэкспозиции в 120 секунд было отмечено, что имеются, как разрушенные, так и сохранные железы, эпителий желез на большем протяжении был разрушен, тотально слущен в просвет, отмечались отдельные железы с частично слущенным эпителием и сохранными железами. Данные гистологические изменения наблюдались в пределах 5 мм от места введения криозонда. Однако, тотальный некроз желез и стромы не был достигнут.

Учитывая литературные данные об эффективности двойного цикла замораживания при криоабляции, а также с целью определения максимальных возможностей оборудования ErbeCryo2 и низких температур углекислого газа при карбоксикриоабляции ткани предстательной железы, нами были проведены дополнительные эксперименты с двойным циклом замораживания и увеличенным временем криоэкспозиции для достижения тотального некроза ткани предстательной железы.

Криоабляция выполнялась с режимами криоэкспозиции в 240 и 480 секунд двойным циклом замораживания и одним циклом оттаивания правой и левой доли

предстательной железы. Всего было выполнено три эксперимента на трех человеческих предстательных железах.

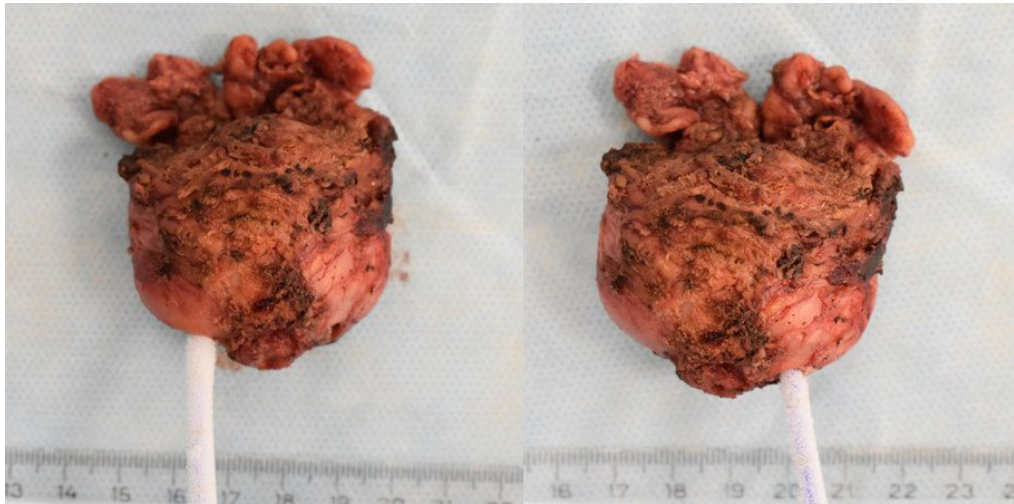
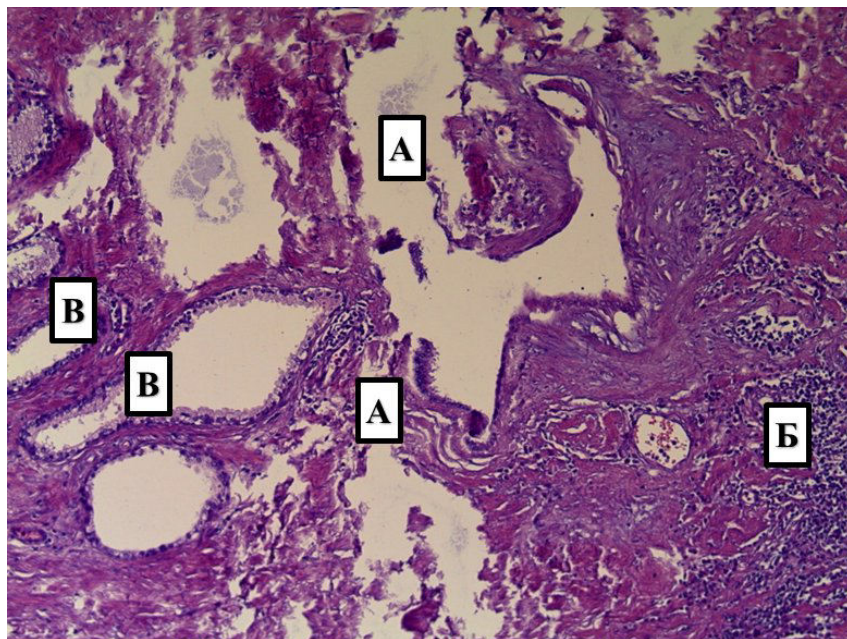


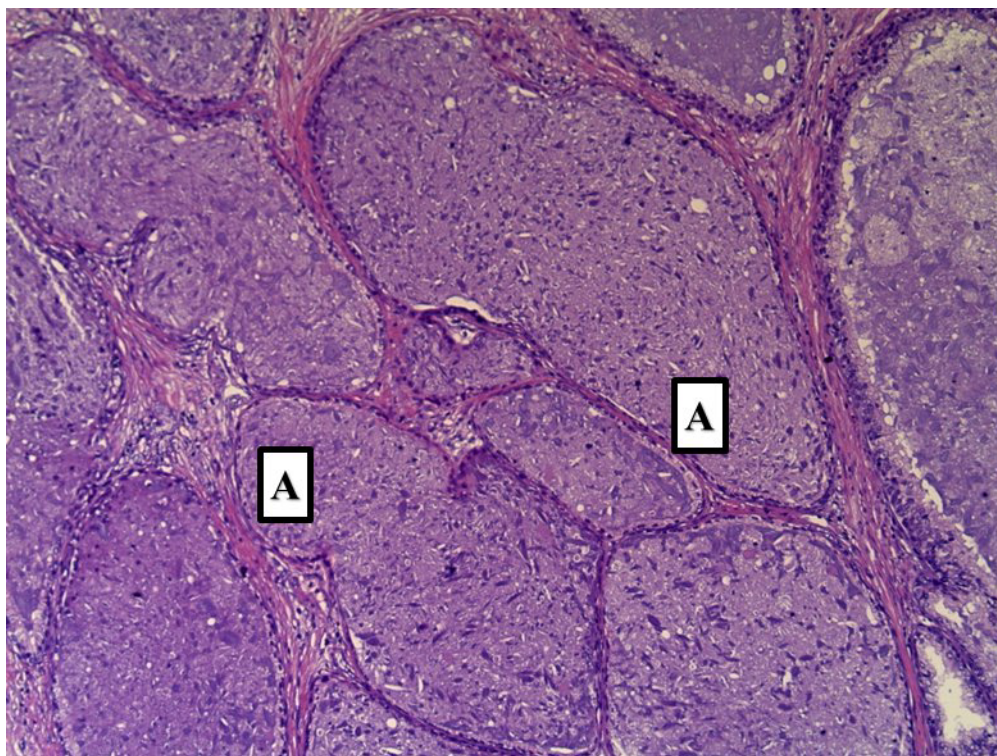
Рисунок 45 – Криоабляция правой и левой доли предстательной железы

Во всех зонах криоабляции от места введения криозонда и на расстоянии до 5мм от него отмечались, как разрушенные, так и сохраненные железы, резкий отек стромы предстательной железы, атрофия эпителия желез и умеренно выраженная лимфо-гистиоцитарная инфильтрация.



Примечание: Окраска гематоксилином и эозином, увеличение X100. А – разрушенные железы и искусственно измененная строма. Б – воспалительная лимфо-гистиоцитарная инфильтрация. В – сохраненные железы

Рисунок 46 – Микрофотограмма предстательной железы. Участок ткани предстательной железы в зоне введения криозонда



Примечание: Окраска гематоксилином и эозином, увеличение X100. А – железы с явлениями выраженной атрофии, эпителий желез частично разрушен, слущен в просвет

Рисунок 47 – Микрофотограмма предстательной железы. Участок ткани предстательной железы на расстоянии 0,5см от зоны введения криозонда

По данным патоморфологического исследования, а также температурных характеристик отмечено, что наиболее выраженные изменения ткани предстательной железы и низкие температурные показатели отмечались в зоне непосредственной криоабляции. Температурные показатели и структура ткани предстательной железы оставались неизменными на расстоянии 5 мм от кончика криозонда. Независимо от времени криоэкспозиции (120, или 240, или 480 секунд), одинарного или двойного цикла замораживания тотальный некроз при карбоксикриоабляции ткани предстательной железы не отмечался ни в одном из экспериментов *in vitro* на удаленной человеческой предстательной железе.



Рисунок 48 – Признаки образования ледяного шара на разрезанной предстательной железе при выполнении карбоксикриоабляции

3.4 Криобиопсия и криоэкстракция опухоли мочевого пузыря

Данное экспериментальное исследование направлено на оценку возможности проведения трансуретральной карбоксикриобиопсии (ККБ) и карбоксикриоэкстракции (ККЭ) опухоли мочевого пузыря (МП) с последующим патоморфологическим исследованием с целью определения сохранности и уровня качества полученного биоптата и сравнительного анализа с классической трансуретральной электробиопсией [15].

Основным материалом эксперимента послужили фрагменты опухолевых тканей мочевого пузыря, которые были получены в ходе плановой трансуретральной резекции (ТУР) стенки пораженного мочевого пузыря [15].

В рамках клинического и инструментального обследования (УЗИ, МРТ ОМТ) у пациента К. 65 лет было выявлено объемное образование по правой боковой стенке мочевого пузыря. Размеры новообразования – 45х24 мм. Для проведения дифференциальной диагностики и хирургического лечения пациенту выполнена ТУР (Рисунок 49) [15].

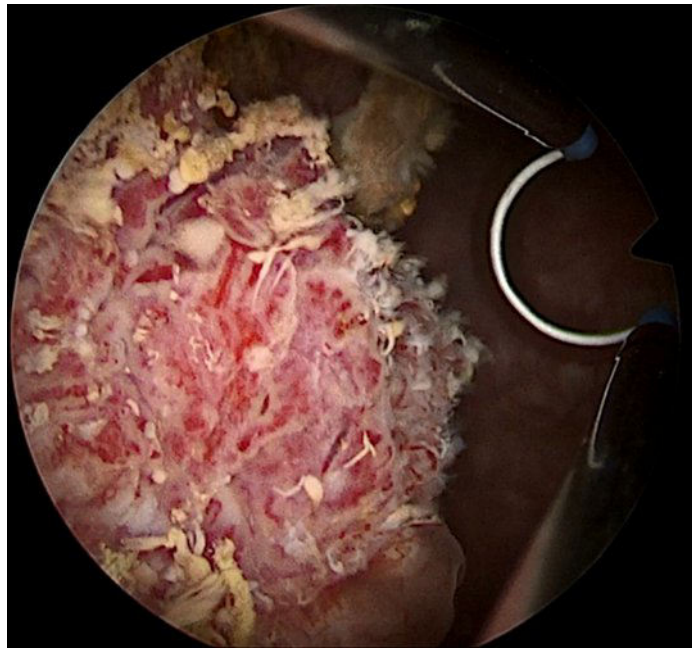


Рисунок 49 – Трансуретральная резекция опухоли мочевого пузыря

Экспериментальное исследование *in vitro* проводилось с целью определения возможности выполнения эффективной карбоксикриоэкстракции опухолевых тканей мочевого пузыря.



Рисунок 50 – Фрагменты опухоли после трансуретральной резекции

В рамках проведенной трансуретральной резекции опухолевых тканей мочевого пузыря было получено несколько фрагментов различных размеров. Эксперимент по проведению карбоксикриоэкстракции осуществлялся на 5 фрагментах опухоли МП размерами от 4 мм до 23 мм. Все фрагменты опухолевой ткани были размещены в растворе 0,9% NaCl комнатной температуры. Последовательно к каждому фрагменту был подведен гибкий криозонд и

выполнена карбоксикриозаморозка. В результате низкотемпературного воздействия фрагмент опухолевой ткани фиксировался к кончику криозонда и производилась карбоксикриоэкстракция (Рисунок 51-52) [15]. Общее время криозаморозки до фиксации фрагментов составляло 5-7 секунд.

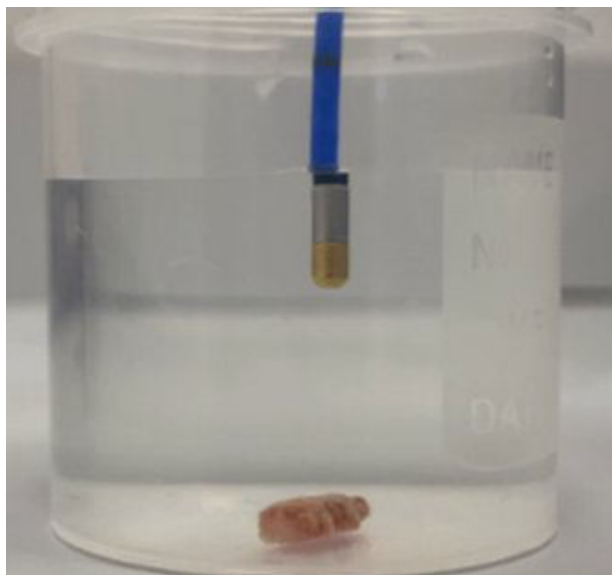


Рисунок 51 – Криоэкстракция фрагмента опухоли

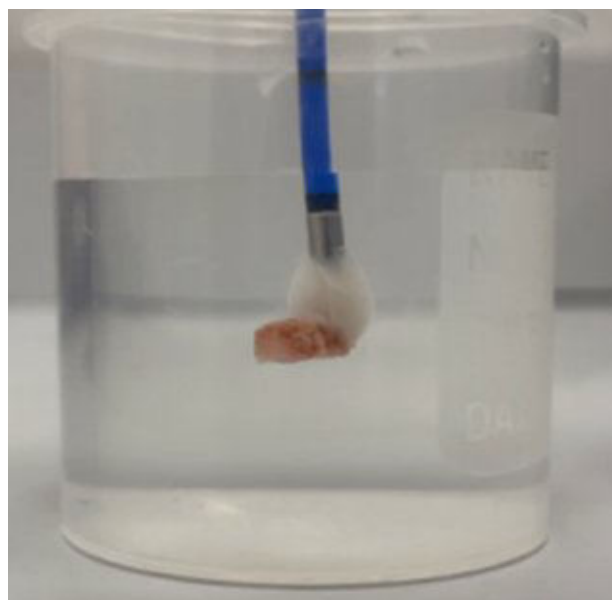
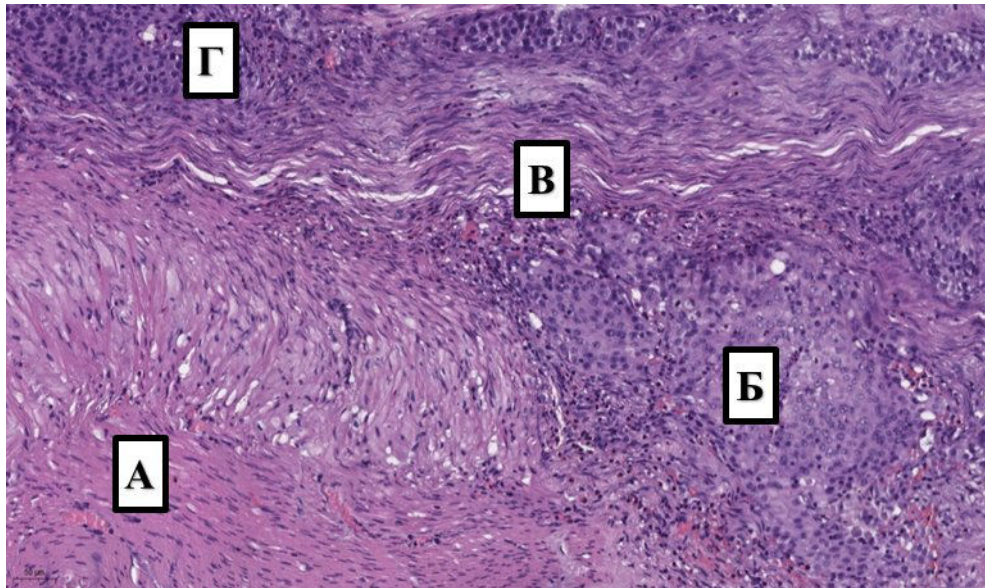


Рисунок 52 – Криоэкстракция фрагмента опухоли

В результате экспериментального исследования была успешно выполнена криоэкстракция с использованием CO_2 в качестве хладагента всех фрагментов

опухолевой ткани мочевого пузыря, что, несомненно, доказывает эффективность применения углекислого газа в криохирургической практике [15].



Примечание: Микрофотография с длиной изображения 50 μm (микрометров). Окрашивание гематоксилином и эозином. А – мышечная оболочка стенки мочевого пузыря со слабо выраженной лимфоидной инфильтрацией и тонкостенными сосудами. Б – инвазия уротелиального рака – G3 (high-grade) в толщу мышечной оболочки. В – обильная инфильтрация лимфо-макрофагальными элементами и плазмócитами по периферии очага опухолевой инвазии. Г – инвазия опухоли в поверхностные пучки мышечной оболочки

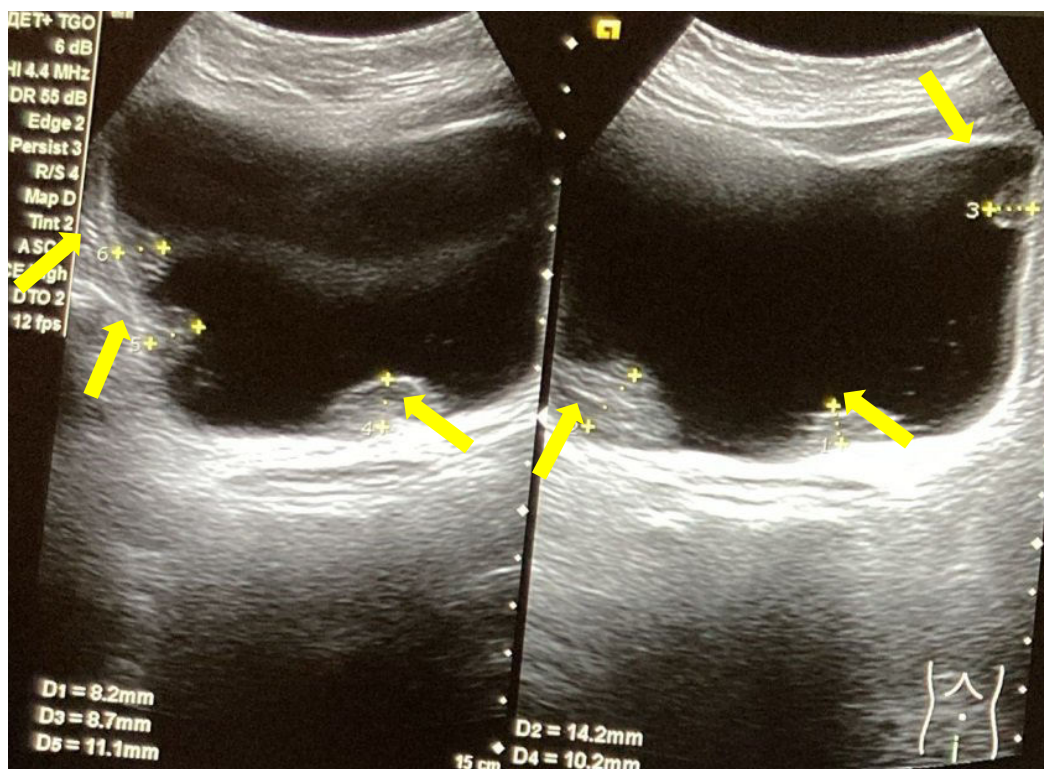
Рисунок 53 – Микрофотография опухолевой ткани мочевого пузыря

По результатам патоморфологического исследования биопсийного материала фрагментов опухолевой ткани мочевого пузыря установлено, что все фрагменты имеют выраженные признаки коагуляционного повреждения – результат трансуретральной электробиопсии [15]. Опухоль имеет инфильтрирующий тип роста, подтверждающийся отсутствием базальной мембраны. Видимые опухолевые клетки мочевого пузыря имеют выраженные признаки атипии и ядерный полиморфизм. Отмечается перитуморальная воспалительная инфильтрация тканей [15].

В последующем нами было проведено экспериментальное исследование *in vitro* на удаленном мочевом пузыре с опухолями, с целью оценки возможности техники выполнения карбоксикриобиопсии и карбоксикриоэкстракции опухолей

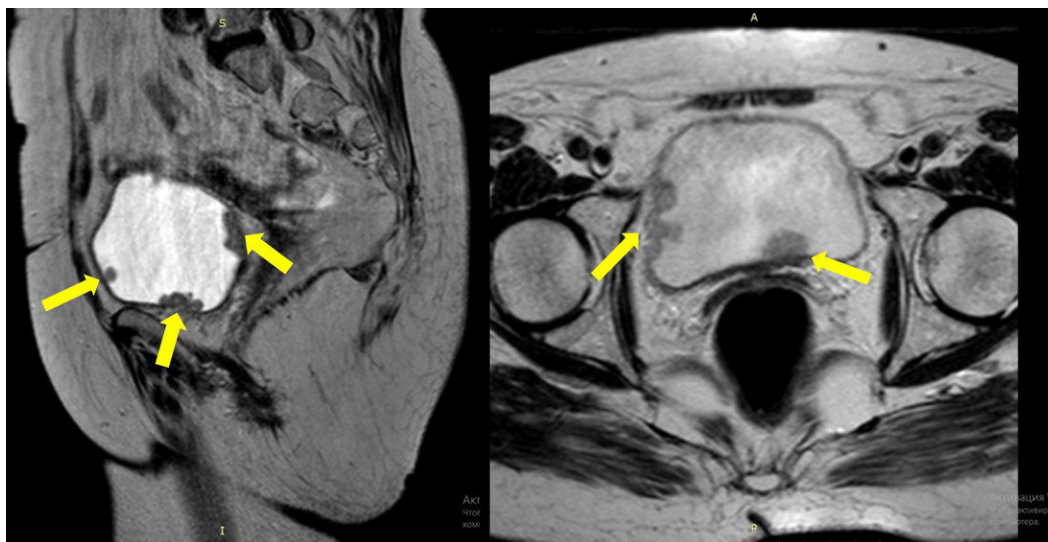
МП, анализа патоморфологических изменений в удаляемой ткани опухолей МП и проведения сравнительного анализа сохранности биопсийного материала.

Исходно пациентка Ч. 75 лет впервые в жизни отметила примесь крови в моче. По месту жительства пациентом выполнен ряд диагностических исследований (УЗИ, МРТ ОМТ), по результатам которых обнаружены множественные образования мочевого пузыря различных размеров (максимально до 27 мм). Образования активно накапливают контрастный препарат [15]. С целью дифференциальной диагностики и определения дальнейшей тактики лечения выполнена ТУР-биопсия стенки мочевого пузыря [23]. Гистологическое заключение: инвазивный папиллярный уротелиальный рак мочевого пузыря высокой степени злокачественности G3. Учитывая данные гистологического заключения с целью предотвращения прогрессирования онкологического процесса выполнена лапароскопическая цистоуретрэктомия с формированием илеокондуита по Брикеру. Обязательным условием экспериментального исследования было наличие письменного согласия больной.



Примечание: опухоли указаны стрелками

Рисунок 54 – Ультразвуковое исследование мочевого пузыря с опухолями



Примечание: опухоли указаны стрелками

Рисунок 55 – Магнитно-резонансная томография мочевого пузыря с опухолями

С целью адекватного притока ирригационной жидкости и наполнения мочевого пузыря, дистальные отделы мочеточников были перевязаны простыми узловыми швами. Дистальный отдел мочеиспускательного канала был фиксирован непрерывным узловым швом вокруг эндоскопа. Вся манипуляция проходила под постоянным притоком ирригационной жидкости (NaCl 0,9%).

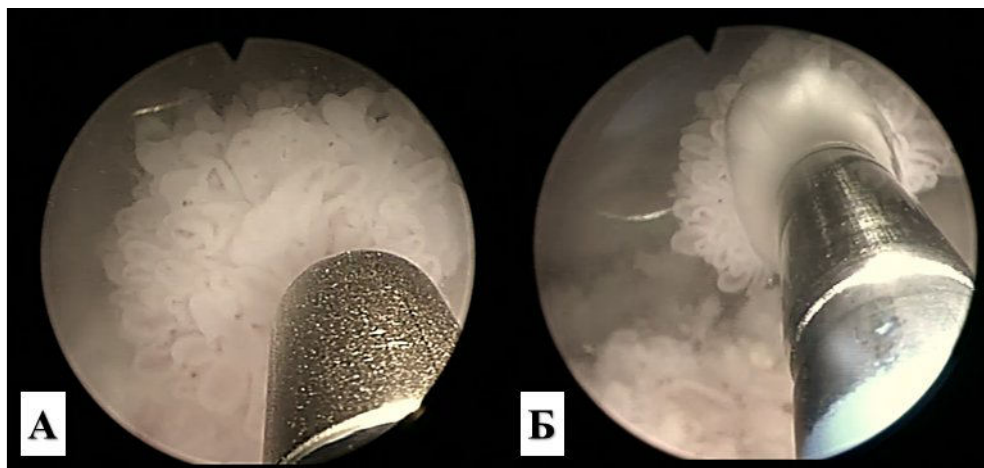
После фиксации макропрепарата на операционном столе (Рисунок 56) эндоскоп компании Karl Storz 25Ch был проведен по мочеиспускательному каналу до мочевого пузыря [15].



Рисунок 56 – Удаленный мочевой пузырь с опухолями

Цистоскопия производилась цифровым эндоскопом с диаметром рабочего канала 4 мм (Karl Storz 12Ch). По всем стенкам мочевого пузыря были выявлены множественные нежноворсинчатые образования на узких ножках. Следующим этапом по левой боковой стенке мочевого пузыря была выполнена карбоксикриобиопсия опухолевых тканей гибким криозондом диаметром 2,4 мм [15]. Продолжительность криовоздействия с последующей фиксацией фрагмента опухоли к наконечнику зонда составило 35 сек. Криозаморозка продолжалась до момента извлечения инструмента из макропрепарата с целью предупреждения возможной потери биопсийного материала [15].

Выполнение процедуры криобиопсии с использованием CO₂ в качестве хладагента включает следующие этапы: 1) дистальный кончик гибкого криозонда подведен к опухолевой ткани мочевого пузыря по левой боковой стенке; 2) установлен плотный контакт наконечника криозонда с тканью опухоли мочевого пузыря; 3) выполнено криовоздействие с экспозицией 35 сек (Рисунок 57 – А); 4) произведена тракция опухолевой ткани до получения зафиксированного к наконечнику гибкого криозонда фрагмента опухолевой ткани (Рисунок 57 - Б) [15].



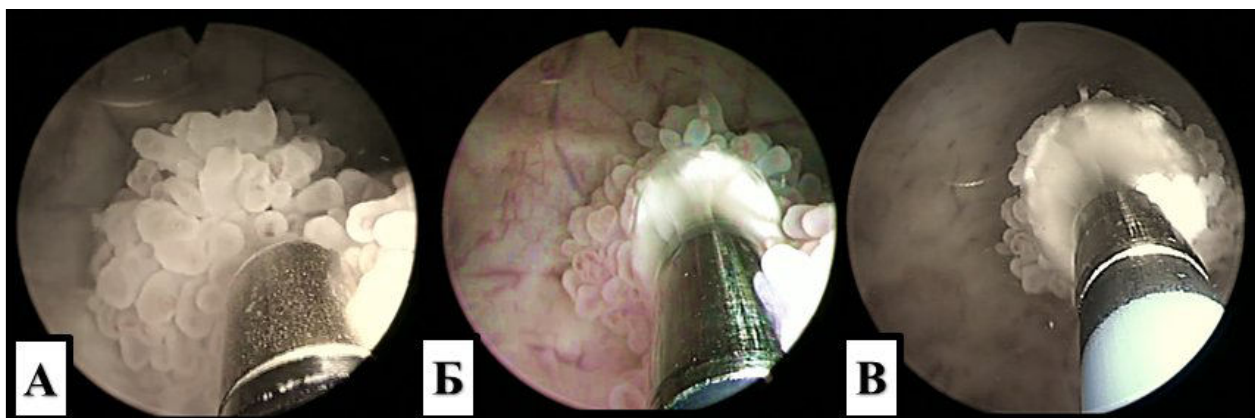
Примечание: А – этап криобиопсии опухолевой ткани мочевого пузыря. Б – фрагмент опухолевой ткани мочевого пузыря фиксирован на наконечнике криозонда

Рисунок 57 – Фотография основных этапов эндоскопической карбоксикриобиопсии опухолевой ткани мочевого пузыря

Следующим этапом, для оценки возможностей карбоксикриобиопсии в

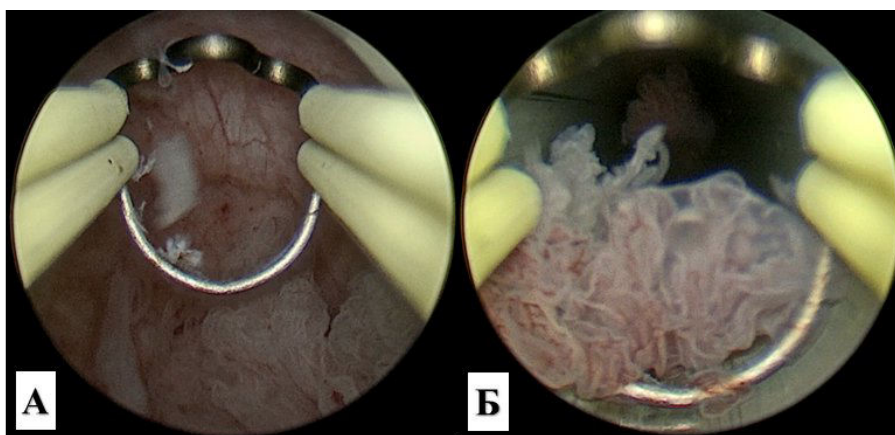
отношении крупных фрагментов опухолевой ткани, была произведена криозаморозка и экстракция фрагмента опухолевой ткани мочевого пузыря больших размеров (Рисунок 58) [15].

Опухолевые ткани мочевого пузыря по задней стенке были удалены с использованием биполярной петли с последующей ТУР-биопсией (Рисунок 59) [15]. Полученные фрагменты опухолевой ткани отправлены на патоморфологическое исследование с последующим сравнительным патогистологическим анализом двух методов биопсии и экстракции опухолевых тканей (Рисунок 60) [15].



Примечание: А – подведение дистального конца криозонда к опухолевой ткани мочевого пузыря, Б – этап карбоксикриоэкстракции опухолевой ткани мочевого пузыря, В – фрагмент опухоли мочевого пузыря, фиксированный на наконечнике криозонда

Рисунок 58 – Фотография основных этапов эндоскопической карбоксикриоэкстракции опухолевой ткани мочевого пузыря

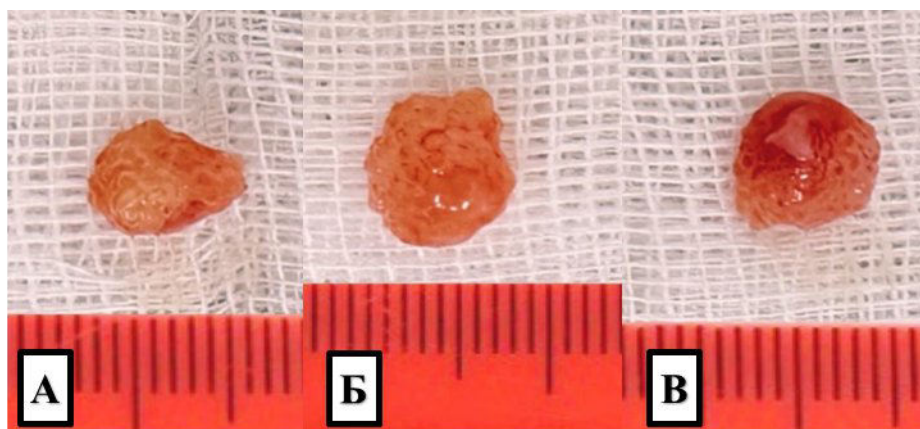


Примечание: А – подведение петли к опухоли МП. Б – этап ТУР-биопсии опухоли МП.

Рисунок 59 – Эндоскопическая картина ТУР-биопсии опухолевой ткани мочевого пузыря



Рисунок 60 – Удаленный мочевой пузырь с опухолями на разрезе

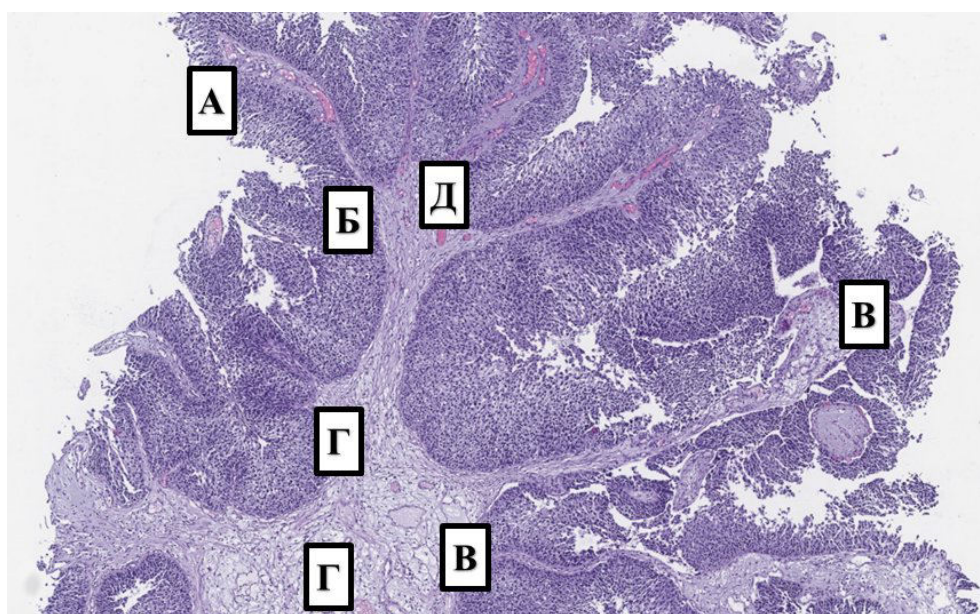


Примечание: А – фрагмент опухоли мочевого пузыря по левой боковой стенке (карбоксикриобиопсия). Б – фрагмент опухоли мочевого пузыря по задней стенке (карбоксикриоэкстракция). В – фрагмент опухоли мочевого пузыря по задней стенке (ТУР-биопсия)

Рисунок 61 – Фрагменты опухоли мочевого пузыря

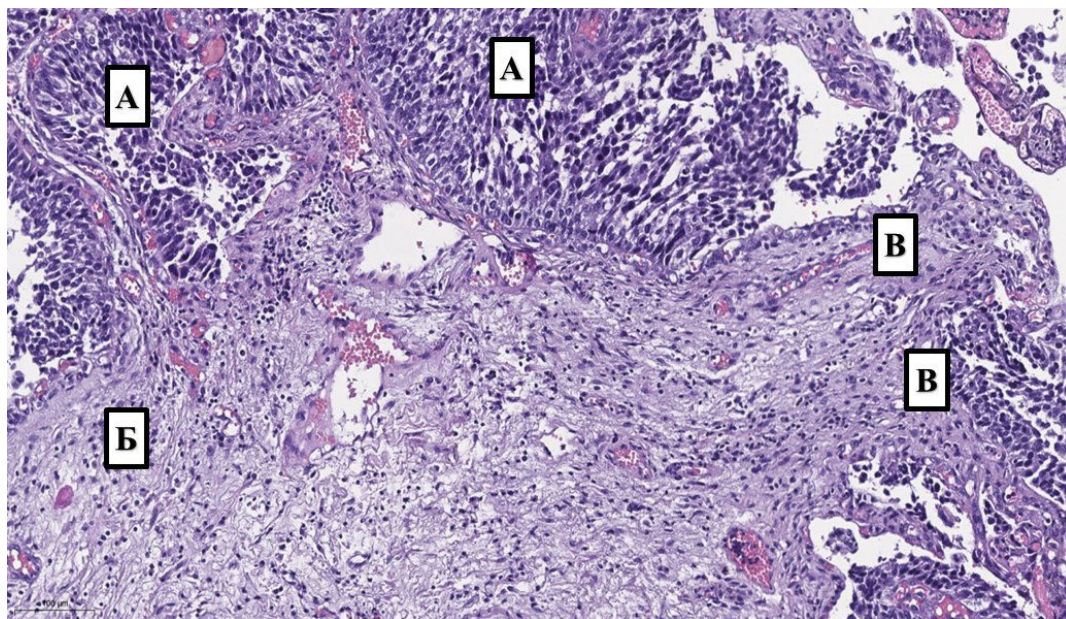
Фрагменты опухолевой ткани мочевого пузыря, полученные с помощью карбоксикриобиопсии и ТУР-биопсии, были направлены на патоморфологическое исследование. При анализе патоморфологической картины фрагментов, полученных при карбоксикриоэкстракции, определяются папиллярные структуры опухолевой ткани с признаками слабо выраженного ядерного полиморфизма. Признаков коагуляции эпителиального и стромального компонентов не выявлено

[15]. Опухолевые ткани имеют мягкую ворсинчатую структуру с признаками частичного сращивания эпителиальных клеток [15]. Стромальный компонент сосочков опухолевой ткани рыхлый с множественными тонкостенными сосудами, с признаками отека и незначительной лимфоидной инфильтрацией. Базальная мембрана сохранена и имеет четкую границу. Подслизистый слой с признаками лимфо-макрофагальной инфильтрации. Состав клеточного инфильтрата можно оценить на большем увеличении. Просвет тонкостенных полнокровных сосудов представлен клеточными элементами крови: эритроцитами и лейкоцитами [15].



Примечание: Микрофотография с длиной изображения 50 μm (микрометров). Окрашивание гематоксилином и эозином. А – папиллярные опухолевые структуры. Б – сохраненный уротелий. В – слой базальных клеток, формирующих базальную мембрану уротелия. Г – подслизистая основа с явлениями отека, лимфо-плазмоцитарной инфильтрацией. Д – тонкостенные сосуды

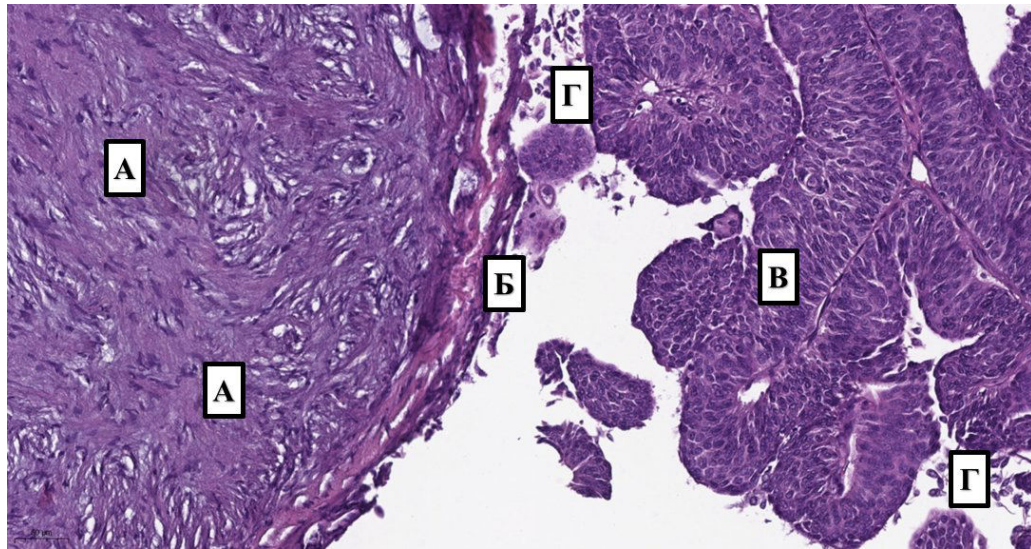
Рисунок 62 – Микрофотография опухолевой ткани мочевого пузыря
(карбоксикриобиопсия)



Микрофотография с длиной изображения 200 μm (микрометров). Окрашивание гематоксилином и эозином. А – папиллярные опухолевые структуры. Б – сохранная подслизистая основа с сосудами. В – опухолевые структуры частично слущены, в связи с консистенцией

Рисунок 63 – Микрофотография опухолевой ткани мочевого пузыря (карбоксикриоэкстракция)

При патоморфологическом и гистологическом исследовании фрагментов опухолевой ткани, полученной после ТУР-биопсии, обнаружены: ворсинчатые структуры опухолевой ткани с признаками частичного слущивания эпителиальных клеток и коагуляции. Между сосочками определяются тонкостенные сосуды с явлениями кровоизлияния. Подслизистый слой имеет признаки фиброза и коагуляции. В собранном материале присутствуют артефакты сдавливания [15].



Микрофотография с длиной изображения 50 μm (микрометров). Окрашивание гематоксилином и эозином. А – подслизистая основа с признаками фиброза. Б – выраженные явления коагуляции ткани по периферии. В – папиллярные опухолевые структуры с признаками коагуляции ткани. Г – опухолевые структуры слущены

Рисунок 64 – Микрофотография опухолевой ткани мочевого пузыря (ТУР-биопсия)

Таким образом, проведенные эксперименты продемонстрировали возможность применения карбоксикриобиопсии и карбоксикриоэкстракции для получения и эвакуации фрагментов опухолевых тканей мочевого пузыря. Главными преимуществами данного метода по сравнению с классической ТУР-биопсией являются: отсутствие признаков коагуляции опухолевых тканей и артефактов сдавливания при исследовании собранного материала, вероятное отсутствие обтурационного синдрома (электрический ток не используется во время манипуляции), лучшая сохранность биоптата при замораживании [15]. Экспериментальные исследования подтвердили, что криобиопсия и криоэкстракция на основе CO_2 – воспроизводимые хирургические манипуляции с целым рядом преимуществ над классическими методами, а также позволили провести глубокую оценку возможного влияния низкотемпературного воздействия углекислого газа на ткани мочевого пузыря [15].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На фоне всеобщего стремления к снижению инвазивности оперативных вмешательств все большую популярность набирает такая альтернатива классическому хирургическому лечению как криоабляция. Криохирургические операции урологического профиля, такие как криоабляции и криобиопсия, выполняются при злокачественных новообразованиях почки и предстательной железы [13]. Хотя и классическое хирургическое лечение является золотым стандартом при данных заболеваниях, криоабляция может быть выполнена той категории пациентов кому противопоказано хирургическое лечение в связи с отягощенным соматическим статусом. Основным действующим хладагентом является аргон. Низкие температуры данного хладагента приводят к некрозу опухолевых клеток.

В криохирургических установках помимо аргона может быть использован углекислый газ, который активно применяется уже сегодня в области торакальной хирургии. На низкотемпературном воздействии CO_2 основаны такие методы как криореканализация, криодевастилизация, криобиопсия. Несмотря на активное применение CO_2 в торакальной хирургии, в урологической практике углекислый газ в качестве хладагента не используется [15].

Диссертационная работа направлена на изучение влияния и возможных эффектов низкотемпературного воздействия углекислого газа на ткани почки, предстательной железы, мочевого пузыря, а также определение возможности применения и внедрения данной методики у пациентов урологического профиля [15].

В ходе экспериментального исследования основным материалом для изучения влияния и возможных эффектов низкотемпературного воздействия углекислого газа на ткани послужила свиная почка [13], которая имеет схожие показатели термоёмкости с предстательной железой. При проведении экспериментальных исследований на свиной почке, как *in vitro*, так и *in vivo* нами было отмечено, что выполнение криоабляции при помощи хладагента

углекислого газа приводит к деструкции и необратимой гибели (некрозу) почечной ткани. При выполнении криоабляции на «неживой» свиной почке визуальное диаметра ледяного шара составлял в среднем 10 ± 2 мм при экспозиции 120 секунд. После выполнения криоабляции режимом экспозиции 120 секунд на «живой» свиной почке при помощи лапароскопического доступа, было выполнено патоморфологическое исследование. По итогу было отмечено, что криоабляция приводит к некрозу почечной ткани диаметром 1,0 см. Также были выполнены эксперименты с проведением двойного цикла замораживания и увеличенным временем криоэкспозиции до 240 секунд. По итогу не было отмечено разницы в диаметре некроза ткани почки между одинарным или двойным циклом замораживания и между режимами экспозиции в 120 или 240 секунд.

Для оценки влияния низких температур углекислого газа на ткань предстательной железы в дальнейших экспериментальных исследованиях материалом служила удаленная человеческая предстательная железа. Экспериментальные исследования на удаленной предстательной железе показали, что криоабляция одинарным циклом замораживания с экспозицией в 120 секунд приводит к разрушению отдельных желез, атрофии эпителия желез и отеку стромы в зоне 5 мм от места введения криозонда. Для достижения тотального некроза ткани предстательной железы были выполнены экспериментальные исследования с двойным циклом замораживания и увеличенным временем криоэкспозиции до 240 и 480 секунд. По итогу были отмечены схожие патоморфологические изменения ткани предстательной железы, что и при проведении экспериментов с одинарным циклом замораживания и режимом экспозиции в 120 секунд. Эксперименты на предстательную железу показывают, что криоабляция углекислым газом не приводит к тотальному некрозу ткани предстательной железы, а способствует лишь обратимым изменениям ткани в пределах 0,5 см от места введения криозонда общим диаметром 1,0 см.

Оценка низкотемпературного воздействия CO_2 и определение возможностей использования карбоксикриобиопсии и карбоксикриоэкстракции производилась в

рамках двух экспериментов: *in vitro* с фрагментами опухоли мочевого пузыря и *in vitro* с удаленным мочевым пузырем с множественными опухолями [13]. В первом *in vitro* эксперименте для первичной оценки возможности эвакуации ткани и влияния низких температур углекислого газа на опухоль мочевого пузыря проводилась криоэкстракция фрагментов опухоли мочевого пузыря, полученных после трансуретральной резекции. Во втором *in vitro* эксперименте с использованием удаленного мочевого пузыря с множественными опухолями проводился сравнительный анализ карбоксикриобиопсии и классической трансуретральной электробиопсии опухолевых тканей мочевого пузыря. Результаты первого экспериментального исследования подтвердили возможность применения углекислого газа в качестве хладагента при проведении карбоксикриоэкстракции. Доказано, что процедура полностью воспроизводима и позволяет эффективно эвакуировать фрагменты опухолевой ткани мочевого пузыря независимо от их размеров. Результаты второго экспериментального исследования доказывают возможность получения биоптата высокого качества – без эффекта коагуляции и сдавливания опухолевой ткани – при выполнении карбоксикриобиопсии и карбоксикриоэкстракции. Гистологическое исследование полученного биоптата является наиболее информативным и достоверным в сравнении с применением метода классической ТУР-биопсии. Криобиопсия с использованием углекислого газа наиболее вероятно позволяет избежать развитие обтурационного синдрома, который возникает при использовании электрического тока классической ТУР-биопсии [15].

ВЫВОДЫ

1. В эксперименте *in vitro* и *in vivo* криоабляция на основе низких температур углекислого газа приводит к деструкции и некрозу ткани свиной почки.
2. В эксперименте *in vitro* при заданных параметрах и используемом в эксперименте оборудовании криоабляция на основе низких температур углекислого газа не приводит к некрозу ткани человеческой предстательной железы.
3. Оптимальным режимом криоэкспозиции при карбоксикриоабляции в эксперименте *in vitro* и *in vivo* для получения зоны некроза ткани почки диаметром 1.0 см составляет 120 секунд одинарным циклом замораживания.
4. Отработать режимы карбоксикриоэкспозиции на ткани предстательной железы в эксперименте *in vitro* не представляется возможным, так как при заданных параметрах и используемом в эксперименте оборудовании не удалось получить некроз ткани удаленной человеческой предстательной железы.
5. Карбоксикриобиопсия и карбоксикриоэкстракция опухолевой ткани мочевого пузыря позволяет получить и эффективно эвакуировать биопсийный материал высокого качества без явлений коагуляции и сдавливания в сравнении с классической ТУР-биопсией. Помимо этого, криобиопсия с использованием CO₂ в качестве хладагента наиболее вероятно, исключена исключает вероятность неконтролируемой травмы мочевого пузыря, связанной с обтураторным синдромом.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные в эксперименте результаты карбоксикриоабляции ткани почки и карбоксикриобиопсии опухоли мочевого пузыря могут быть использованы для проведения дальнейших экспериментальных и научно-исследовательских работ по созданию отечественной криоустановки на основе углекислого газа (CO₂).

2. Для криобиопсии опухоли мочевого пузыря на «ножке» размерами до 2 см кончик криозонда нужно установить у основания «ножки» опухоли, что позволяет удалить опухоль блоком, не нарушая ее целостность.

3. Для криобиопсии крупной опухоли мочевого пузыря или опухоли на широком основании кончик криозонда нужно установить у основания наиболее крупного флотирующегося фрагмента опухоли, что позволяет получить полноценный фрагмент опухоли.

4. При экстракции опухоли мочевого пузыря или фрагмента опухоли необходимо продолжать криозаморозку до момента ее полного удаления из тубуса инструмента.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

HIFU - High Intensity Focused Ultrasound

ГПЖ – гиперплазия предстательной железы

ККБ – карбоксикриобиопсия

ККЭ – карбоксикриоэкстракция

МРТ – магнитно-резонансная томография

МСКТ – мультиспиральная компьютерная томография

НЭП – необратимая электропорация

ПЖ – предстательная железа

РПЖ – рак предстательной железы

ТРУЗИ – трансректальное ультразвуковое исследование

ТУР – трансуретральная резекция

УЗИ – ультразвуковое исследование

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Альперович, Б. И. Криохирургия печени и поджелудочной железы / Б. И. Альперович, Л. М. Парамонова, Н. В. Мерзликин. – Томск : Изд-во Том. ун-та, 1985. – 125 с. : ил.
2. Бадьян, К. И. Современные подходы к прогнозированию риска развития рецидива рака предстательной железы после HIFU : дис. ... канд. мед. наук : 14.01.12 / Бадьян Константин Игоревич ; ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России. – Ростов-на-Дону, 2018. - 157 с.
3. Басиашвили, Г. Т. Оценка риска осложнений и возможности их снижения у больных после операций при раке предстательной железы : дис. ... канд. мед. наук : 14.01.12 / Басиашвили Георгий Тариелович ; ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет». – Казань, 2019. – 123 с.
4. Буров, А. К. Воздействие ультразвуковых колебаний высокой интенсивности на злокачественные опухоли у животных и человека / А. К. Буров, Г. Д. Андреевская // ДАН СССР. – 1956. – Т. 106. – №. 3. – С. 445-448.
5. Васильев, А. О. Криоабляция предстательной железы : дис. ... канд. мед. наук : 14.01.23 / Васильев Александр Олегович ; ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России. – Москва, 2015. – 143 с.
6. Васильев, С. А. Применение криохирургического метода в нейрохирургии / С. А. Васильев, С. Б. Песня-Прасолов // Нейрохирургия. – 2009. – № 4. – С. 63-70.
7. Говоров, А. В. Глава 20. Криоабляция предстательной железы / А. В. Говоров, О. Н. Васильев, Д. Ю. Пушкарь // Рак простаты: от протеомики и геномики к хирургии : Коллективная монография / Научные редакторы М.И. Коган, Д.Ю. Пушкарь. – Москва : Издательский дом "АБВ-пресс", 2019. – С. 310-324.
8. Говоров, А. В. Криоабляция в лечении рака предстательной железы : дис. ... д-ра мед. наук : 14.01.23 / Говоров Александр Викторович ; ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России. – Москва, 2016. – 216 с.

9. Говоров, А. В. Основы криобиологии рака предстательной железы / А. В. Говоров, А. О. Васильев, Д. Ю. Пушкарь // Владикавказский медико-биологический вестник. – 2015. – Т. 21. – № 32. – С. 76-83.

10. Давакиджи, Л. Ю. Криодеструкция доброкачественной гиперплазии предстательной железы при высокой степени операционного риска : автореферат дис. ... канд. мед. наук : 14.00.40 / Давакиджи Лаван Юсуф ; ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России. – Санкт-Петербург, 1997. – 11 с.

11. Жернов, А. А. Криоабляция опухоли почки / А. А. Жернов, А. В. Корякин // Экспериментальная и клиническая урология. – 2011. – № 2-3. – С. 109-111.

12. История криохирургии / В. А. Кубышкин, Д. А. Ионкин, С. В. Кунгурцев [и др.] // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2015. – № 5. – С. 62-74.

13. Карбоксикриоабляция почки. Экспериментальное исследование / А. Д. Дамиев, Г. Н. Акопян, Е. В. Шпоть [и др.] // Урология. – 2022. – № 2. – С. 71-76.

14. Карбоксикриоабляция предстательной железы в эксперименте / А. Д. Дамиев, Е. В. Шпоть, Г. Н. Акопян [и др.] // Вопросы урологии и андрологии. – 2024. – № 3. – С. 17–21.

15. Карбоксикриобиопсия и карбоксикриоэкстракция опухоли мочевого пузыря. экспериментальное исследование / А. Д. Дамиев, Е. В. Шпоть, Г. Н. Акопян [и др.] // Урология. – 2023. – № 4. – С. 24-30.

16. Криохирургия / под ред. А. Ш. Ревитшвили, А. В. Чжао, Д. А. Ионкина. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2019. – 376 с. – ISBN 978-5-9704-4976-9.

17. Леоненков, Р. В. Выбор способа лечения больных билатеральным раком почки : дис. ... канд. мед. наук : 14.01.12 / Леоненков Роман Викторович; ФГБУ «РНЦРХТ им. ак. А. М. Гранова» Минздрава России. – Санкт-Петербург, 2018. – 145 с.

18. Лозина-Лозинский, Л. К. Очерки по криобиологии : Адаптация и устойчивость организмов и клеток к низким и сверхнизким температурам. / Л. К. Лозина-Лозинский. – Ленинград : Наука. Ленингр. отд-ние, 1972. – 288 с.: ил.

19. Лозина-Лозинский, Л. К. Теория криповреждения / Л. К. Лозина-Лозинский // Криобиология и криомедицина. – 1980. – № 2. – С. 3-8.
20. Лопаткин, Н. А. Оперативная урология: (Руководство) / Н. А. Лопаткин, И. П. Шевцова. – Л.: Медицина, 1986. – 480 с.
21. Механизм разрушения биологических тканей при локальной криодеструкции / В. В. Шафранов, Е. Н. Борхунова, М. А. Костылев [и др.] // Вестник РАЕН. – 2012. – Т. 12. – № 1. – С. 68-77.
22. Пушкарев, А. В. Теоретическое и экспериментальное исследование теплообмена при многозондовом низкотемпературном воздействии на биоткани : дис. ... канд. техн. наук : 05.04.03 / Пушкарев Александр Васильевич ; МГТУ им. Н. Э. Баумана. – Москва, 2017. – 178 с.
23. Пшихачев, А. М. Гиперплазия простаты и мочекаменная болезнь в сочетании с новообразованиями органов мочеполовой системы : дис. ... д-ра мед. наук : 14.01.23 ; 14.01.12 / Пшихачев Ахмедхан Мухамедович ; ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). – Москва, 2019. – 329 с.
24. Розенберг, Л. Д. Физика и техника мощного ультразвука / АН СССР. Акустический ин-т ; под ред. проф. Л. Д. Розенберга. - Москва : Наука, 1967. – 377 с.
25. Современная концепция разрушения биологических тканей при локальной криодеструкции / В. В. Шафранов, Е. Н. Борхунова, Д. И. Цыганов [и др.] // Гуманитарный вестник. – 2013. – Т. 12. – № 14. – С. 8.
26. Соловьева, О. В. Криохирургический метод в ветеринарии / О. В. Соловьева // Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные. – 2011. – № 4. – С. 6-11.
27. Трапезников, Н. Н. Лечение первичных опухолей костей / Н. Н. Трапезников. – М. : Медицина, 1968. – 196 с.
28. Фрейдович, А. И. Криодеструкция предстательной железы / А. И. Фрейдович, В.И. Фрейдович // Медицинская техника. – 1970. – № 2. – С. 55-57.

29. Ханевич, М. Д. Крихирургия рака поджелудочной железы / М. Д. Ханевич, Г. М. Манихас – Санкт-Петербург : Аграф+, 2011. – 224 с. : ил.; ISBN 978-5-9529-0037-0.

30. Цыганов, Д. И. Криомедицина: процессы и аппараты / Д. И. Цыганов. – Москва : ЗАО "САЙНС-ПРЕСС", 2011. – 304 с. – ISBN 978-5-88070-275-6.

31. Чинёнов, Д. В. Малоинвазивные методы лечения локализованного рака простаты : дис. ... д-ра мед. наук : 3.1.13. / Чинёнов Денис Владимирович ; ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). – Москва, 2024. – 213 с.

32. Эффективность криовоздействия в зависимости от количественных и качественных режимов замораживания и оттаивания / А. В. Говоров, А. О. Васильев, М. В. Ковылина [и др.] // Экспериментальная и клиническая урология. – 2015. – № 1. – С. 24-29.

33. A pilot study of endoscopic spray cryotherapy by pressurized carbon dioxide gas for Barrett's esophagus / H. B. Xue, H. H. Tan, W. Z. Liu, [et al.] // Endoscopy. – 2011. – Vol. 43. – № 5. – P. 379-385.

34. A systematic review of irreversible electroporation in localised prostate cancer treatment / A. Morozov, M. Taratkin, E. Barret, [et al.] // Andrologia. – 2020. – Vol. 52. – № 10. – P. e13789.

35. About Your Prostate Ablation Procedure, 2024. USA, New York, Memorial Sloan Kettering Cancer Center. URL: <https://www.mskcc.org/cancer-care/patient-education/about-prostate-ablation-procedure> (дата обращения: 10.12.2024).

36. Adams-Ray, J. Vascular reactions after experimental cold injury; a microangiographic study of rabbit ears / J. Adams-Ray, S. Bellman // Angiology. – 1956. – Vol. 7. – № 4. – P. 339-367.

37. Allington, H. V. Liquid nitrogen in the treatment of skin diseases / H. V. Allington // California Medicine. – 1950. – Vol. 72. – № 3. – P. 153-155.

38. Aquablation - image-guided robot-assisted waterjet ablation of the prostate: initial clinical experience / P. Gilling, R. Reuther, A. Kahokehr, [et al.] // BJU international. – 2016. – Vol. 117. – № 6. – P. 923-929.

39. Arnott, J. Practical illustrations of the remedial efficacy of a very low or anaesthetic temperature / J. Arnott // *The Lancet*. – 1850. – Vol. 56. – № 1411. – P. 316-318.
40. Baust, J. G. The molecular basis of cryosurgery / J. G. Baust, A. A. Gage // *BJU international*. – 2005. – Vol. 95. – № 9. – P. 1187-1191.
41. Baust, J. Underlying mechanisms of damage and new concepts in cryosurgical instrumentation. In: Lucas, L. Cryosurgery. Mechanism and applications / L. Lucas ; Paris : International Institute of Refrigeration, 1995. – P. 21-36.
42. Bhadra, K. A cone beam CT bronchoscopy study of the ultrathin cryoprobe for biopsy of peripheral lung lesions / K. Bhadra, R. M. Setser, W. Condra, [et al.] // *Journal of Bronchology & Interventional Pulmonology*. – 2024. – Vol. 31. – № 2. – P. 117-125.
43. Bodle, J. F. Susceptibility of uterine myomas and endometrium to cryosurgery using a carbon dioxide cryosurgical probe in vitro / J. F. Bodle, S. R. Duffy, D. M. Binney // *Journal of Minimally Invasive Gynecology*. – 2006. – Vol. 13. – № 6. – P. 500-504.
44. Burge, S. M. Effect of freezing the helix and the rim or edge of the human and pig ear / S. M. Burge, J. P. Shepherd, R. P. Dawber // *Dermatologic Surgery*. – 1984. – Vol. 10. – № 10. – P. 816-819.
45. Cahan, W. G. Cryosurgery of malignant and benign tumors / W. G. Cahan // *Fed Proc*. – 1965. – Vol. 24. – P. S241-S248.
46. Cohen, J. K. Urethral warming catheter for use during cryoablation of the prostate / J. K. Cohen, R. J. Miller, B. A. Shuman // *Urology*. – 1995. – Vol. 45. – № 5. – P. 861-864.
47. Cooper, S. M. The history of cryosurgery / S. M. Cooper, R. P. Dawber // *Journal of the royal society of medicine*. – 2001. – Vol. 94. – № 4. – P. 196-201.
48. Copper, I. S. Cryogenic surgery: a new method of destruction or extirpation of benign or malignant tissues / I. S. Copper // *New England Journal of Medicine*. – 1963. – Vol. 268. – № 14. – P. 743-749.

49. Cryoablation for carcinoma of the prostate / B. G. Patel, C. L. Parsons, M. Bidair, [et al.] // Journal of surgical oncology. – 1996. – Vol. 63. – № 4. – P. 256-264.

50. Cryoablation of the prostate: technical recommendations / S. Cytron, D. Greene, U. Witzsch, [et al.] // Prostate cancer and prostatic diseases. – 2009. – Vol. 12. – № 4. – P. 339-346.

51. Cryobiopsy in the Upper Urinary Tract: Preclinical Evaluation of a Novel Device / J. T. Klein, F. Berger, W. Linzenbold, [et al.] // Urology. – 2019. – Vol. 123. – P. 273-279.

52. Cryobiopsy increases the diagnostic yield of endobronchial biopsy: a multicentre trial / J. Hetzel, R. Eberhardt, F. J. Herth, [et al.] // European Respiratory Journal. – 2012. – Vol. 39. – № 3. – P. 685-690.

53. Cryosurgical changes in the porcine kidney: histologic analysis with thermal history correlation / C. C. Rupp, N. E. Hoffmann, F. R. Schmidlin, [et al.] // Cryobiology. – 2002. – Vol. 45. – № 2. – P. 167-182.

54. EAU - EANM - ESTRO - ESUR - ISUP - SIOG Guidelines on Prostate Cancer 2024 / Edn. presented at the EAU Annual Congress – Paris, 2024. – 239 p. Данные в формате PDF. URL: https://d56bochluxqnz.cloudfront.net/documents/full-guideline/EAU-EANM-ESTRO-ESUR-ISUP-SIOG-Guidelines-on-Prostate-Cancer-2024_2024-04-09-132035_ypmy_2024-04-16-122605_lqpk.pdf (дата обращения: 08.12.2024).

55. EAU Guidelines on Non-Neurogenic Male Lower Urinary Tract Symptoms (LUTS) 2024 / Edn. presented at the EAU Annual Congress – Paris, 2024. – 124 p. Данные в формате PDF. URL: <https://d56bochluxqnz.cloudfront.net/documents/full-guideline/EAU-Guidelines-on-Non-Neurogenic-Male-LUTS-2024.pdf> (дата обращения: 08.12.2024).

56. Effect of high-intensity focused ultrasound on human prostate cancer in vivo / S. Madersbacher, M. Pedevilla, L. Vingers, [et al.] // Cancer research. – 1995. – Vol. 55. – № 15. – P. 3346-3351.

57. Effect of thermal variables on frozen human primary prostatic adenocarcinoma cells / K. Tatsutani, B. Rubinsky, G. Onik, [et al.] // *Urology*. – 1996. – Vol. 48. – № 3. – P. 441-447.

58. Endobronchial cryobiopsy or forceps biopsy for lung cancer diagnosis / Z. Aktas, E. Gunay, N. T. Hoca, [et al.] // *Annals of thoracic medicine*. – 2010. – Vol. 5. – № 4. – P. 242-246.

59. Erinjeri, J. P. Cryoablation: mechanism of action and devices / J. P. Erinjeri, T. W. Clark // *Journal of Vascular and Interventional Radiology*. – 2010. – Vol. 21. – № 8. – P. S187-S191.

60. Five-year follow-up results of a randomized controlled trial comparing bipolar plasmakinetic and monopolar transurethral resection of the prostate / C. Y. Xie, G. B. Zhu, X. H. Wang, X. B. Liu // *Yonsei medical journal*. – 2012. – Vol. 53. – № 4. – P. 734-741.

61. Five-year outcomes for Aquablation therapy compared to TURP: results from a double-blind, randomized trial in men with LUTS due to BPH / P. J. Gilling, N. Barber, M. Bidair, [et al.] // *Can J Urol*. – 2022. – Vol. 29. – № 1. – P. 10960-10968.

62. Flocks, R. H. Perineal cryosurgery for prostatic carcinoma / R. H. Flocks, C. M. Nelson, D. L. Boatman // *The Journal of Urology*. – 1972. – Vol. 108. – № 6. – P. 933-935.

63. Focal prostate cryoablation: initial results show cancer control and potency preservation / D. K. Bahn, P. Silverman, F. Sr. Lee, [et al.] // *Journal of Endourology*. – 2006. – Vol. 20. – № 9. – P. 688-692.

64. Freezing bone without excision. An experimental study of bone-cell destruction and manner of regrowth in dogs / A. A. Gage, G. W. Greene, M. E. Neiders, [et al.] // *JAMA*. – 1966. – Vol. 196. – № 9. – P. 770-774.

65. Gage, A. A. Critical temperature for skin necrosis in experimental cryosurgery / A. A. Gage, J. A. Caruana, M. Montes // *Cryobiology*. – 1982. – Vol. 19. – № 3. – P. 273-282.

66. Gage, A. A. Experimental cryosurgery investigations in vivo / A. A. Gage, J. M. Baust, J. G. Baust // *Cryobiology*. – 2009. – Vol. 59. – № 3. – P. 229-243.

67. Gage, A. A. History of cryosurgery / A. A. Gage // *Seminars in surgical oncology*. – 1998. – Vol. 14. – № 2. – P. 99-109.
68. Gage, A. A. Mechanisms of tissue injury in cryosurgery / A. A. Gage, J. Baust // *Cryobiology*. – 1998. – Vol. 37. – № 3. – P. 171-186.
69. Giampapa, V. C. The vascular effect of cold injury / V. C. Giampapa, C. Oh, A. H. Jr. Aufses // *Cryobiology*. – 1981. – Vol. 18. – № 1. – P. 49-54.
70. Gonder, M. J. Experimental prostate cryosurgery / M. J. Gonder, W. A. Soanes, V. Smith // *Investigative Urology*. – 1964. – Vol. 1. – P. 610-619.
71. Gowardhan, B. Cryotherapy for the prostate: an in vitro and clinical study of two new developments; advanced cryoneedles and a temperature monitoring system / B. Gowardhan, D. Greene // *BJU international*. – 2007. – Vol. 100. – № 2. – P. 295-302.
72. Graded esophageal mucosal ablation with cryotherapy, and the protective effects of submucosal saline / G. S. Raju, I. Ahmed, S. Y. Xiao, [et al.] // *Endoscopy*. – 2005. – Vol. 37. – № 6. – P. 523-526.
73. Grout, B. W. W. The Effects of Low Temperatures on Biological Systems / B. W. W. Grout, G. J. Morris. – Cambridge : Cambridge University Press, 2009. – 516 p. – ISBN 978-0-521-10576-7.
74. Herrmann, T. R. EAU guidelines on laser technologies / T. R. Herrmann, E. N. Liatsikos, U. Nagele, [et al.] // *European urology*. – 2012. – Vol. 61. – № 4. – P. 783-795.
75. Image-guided robot-assisted prostate ablation using water jet-hydrodissection: initial study of a novel technology for benign prostatic hyperplasia / K. Faber, A. L. de Abreu, P. Ramos, [et al.] // *Journal of endourology*. – 2015. – Vol. 29. – № 1. – P. 63-69.
76. In vitro assessment of the efficacy of thermal therapy in human benign prostatic hyperplasia / P. Bhowmick, J. E. Coad, S. Bhowmick, [et al.] // *International journal of hyperthermia*. – 2004. – Vol. 20. – № 4. – P. 421-439.
77. In vitro, ex vivo and in vivo isotherms for renal cryotherapy / J. L. Young, S. B. Kolla, D. L. Pick, [et al.] // *The Journal of urology*. – 2010. – Vol. 183. – № 2. – P. 752-758.

78. Lam, C. M. Ultrasonographic characterization of hepatic cryolesions. An ex vivo study / C. M. Lam, S. M. Shimi, A. Cuschieri // Archives of Surgery. – 1995. – Vol. 130. – № 10. – P. 1068-1072.
79. Lee, E. W. Imaging guided percutaneous irreversible electroporation: ultrasound and immunohistological correlation / E. W. Lee, C. T. Loh, S. T. Kee // Technology in cancer research & treatment. – 2007. – Vol. 6. – № 4. – P. 287-294.
80. Lewis, T. Vascular reactions of the skin to injury. Part III. Some effects of freezing, of cooling and of warming / T. Lewis, W. S. Love // Heart. – 1926. – Vol. 13. – № 27. – P. 19.
81. Long, J. P. Percutaneous cryoablation of the kidney in a porcine model / J. P. Long, G. T. Faller // Cryobiology. – 1999. – Vol. 38. – № 1. – P. 89-93.
82. Lynn, J. G. Biological application of focused ultrasonic waves / J. G. Lynn, R. L. Zwemer, A. J. Chick // Science. – 1942. – Vol. 96. – № 2483. – P. 119-120.
83. Mazur, P. Cryobiology: the freezing of biological systems / P. Mazur // Science. – 1970. – Vol. 168. – № 3934. – P. 939-949.
84. Mazur, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications / P. Mazur // American journal of physiology-cell physiology. – 1984. – Vol. 247. – № 3(1) – P. C125-C142.
85. McGrath, J. J. An experimental comparison of intracellular ice formation and freeze-thaw survival of HeLa S-3 cells / J. J. McGrath, E. G. Cravalho, C. E. Huggins // Cryobiology. – 1975. – Vol. 12. – № 6. – P. 540-550.
86. Megalli, M. R. Closed perineal cryosurgery in prostatic cancer. New probe and technique / M. R. Megalli, E. O. Gursel, R. J. Veenema // Urology. – 1974. – Vol. 4. – № 2. – P. 220-222.
87. Molnár, S. Cryosurgery and its practicability in urology. Clinico-experimental and pathomorphological studies on the canine prostate / S. Molnár, H. Uebel, C. O. Schneider // International Urology and Nephrology. – 1974. – Vol. 6. – № 1. – P. 3-13.
88. Morphologic characterization of acute injury to vascular endothelium of skin after frostbite / L. Marzella, R. R. Jesudass, P. N. Manson, [et al.] // Plastic and reconstructive surgery. – 1989. – Vol. 83. – № 1. – P. 67-76.

89. MR imaging-guided percutaneous cryoablation of the prostate in an animal model: in vivo imaging of cryoablation-induced tissue necrosis with immediate histopathologic correlation / M. A. van den Bosch, S. Josan, D. M. Bouley, [et al.] // *Journal of Vascular and Interventional Radiology*. – 2009. – Vol. 20. – № 2. – P. 252-258.
90. MRI-monitored cryosurgery in the rabbit brain / J. C. Gilbert, B. Rubinsky, M. S. Roos, [et al.] // *Magnetic resonance imaging*. – 1993. – Vol. 11. – № 8. – P. 1155-1164.
91. Mundth, E. D. Studies on the pathogenesis of cold injury: microcirculatory changes in tissue injured by freezing / E. D. Mundth // *Proc Symp Artic Biol Med*. – 1964. – Vol. 4. – P. 51-72.
92. Onik, G. Irreversible electroporation: implications for prostate ablation / G. Onik, P. Mikus, B. Rubinsky // *Technology in cancer research & treatment*. – 2007. – Vol. 6. – № 4. – P. 295-300.
93. Optimal freeze cycle length for renal cryotherapy / J. L. Young, E. Khanifar, N. Narula, [et al.] // *The Journal of urology*. – 2011. – Vol. 186. – № 1. – P. 283-288.
94. Optimal parameters for the destruction of prostate cancer using irreversible electroporation / J. Rubinsky, G. Onik, P. Mikus, [et al.] // *The Journal of urology*. – 2008. – Vol. 180. – № 6. – P. 2668-2674.
95. Percutaneous cryoablation techniques and clinical applications / S. Tatli, M. Acar, K. Tuncali, [et al.] // *Diagnostic and Interventional Radiology*. – 2010. – Vol. 16. – № 1. – P. 90-95.
96. Pittrof, R. Transcervical endometrial cryoablation (ECA) for menorrhagia / R. Pittrof, S. Majid, A. Murray // *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. – 1994. – Vol. 47. – № 2. – P. 135-140.
97. Prostatic cryotherapy: ultrasonographic and pathologic correlation in the canine model / P. J. Littrup, A. Mody, R. Sparschu, [et al.] // *Urology*. – 1994. – Vol. 44. – № 2. – P. 175-183.

98. PSA elevation during prostate cryosurgery and subsequent decline / D. Leibovici, A. Zisman, A. Lindner, [et al.] // *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. – 2005. – Vol. 23. – № 1. – P. 8-11.

99. Randomized trial comparing cryoablation and external beam radiotherapy for T2C-T3B prostate cancer / J. L. Chin, C. K. Ng, N. J. Touma, [et al.] // *Prostate cancer and prostatic diseases*. – 2008. – Vol. 11. – № 1. – P. 40-45.

100. Role of flexible bronchoscopic cryotechnology in diagnosing endobronchial masses / C. L. Chou, C. W. Wang, S. M. Lin, [et al.] // *The Annals of thoracic surgery*. – 2013. – Vol. 95. – № 3. – P. 982-986.

101. Rubinsky, B. Cryosurgery / B. Rubinsky // *Annual review of biomedical engineering*. – 2000. – Vol. 2. – № 1. – P. 157-187.

102. Sale, A. J. Effects of high electric fields on micro-organisms. 3. Lysis of erythrocytes and protoplasts / A. J. Sale, W. A. Hamilton // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 1968. – Vol. 163. – № 1. – P. 37-43.

103. Sequential downgrading of dysplasia in ulcerative colitis using carbon dioxide-based cryotherapy / J. R. Lewis, S. Itzkowitz, H. Zhu, [et al.] // *Endoscopy*. – 2012. – Vol. 44. – № S 02. – P. E96-E97.

104. Single 15-Min Protocol Yields the Same Cryoablation Size and Margin as the Conventional 10-8-10-Min Protocol: Results of Kidney and Liver Swine Experiment / J. D. Werner, A. C. Tregnago, G. J. Netto, [et al.] // *Cardiovascular and interventional radiology*. – 2018. – Vol. 41. – № 7. – P. 1089-1094.

105. Soanes, W. A. Use of cryosurgery in prostatic cancer / W. A. Soanes, M. J. Gonder // *The Journal of Urology*. – 1968. – Vol. 99. – № 6. – P. 793-797.

106. Steponkus, P. L. Freeze/thaw-induced destabilization of the plasma membrane and the effects of cold acclimation / P. L. Steponkus, D. V. Lynch // *Journal of bioenergetics and biomembranes*. – 1989. – Vol. 21. – № 1. – P. 21-41.

107. The parenchymal reaction of the kidney after local freezing / H. Breining, B. Helpap, A. Minderjahn, [et al.] // *Urological research*. – 1974. – Vol. 2. – № 1. – P. 29-31.

108. Transbronchial cryobiopsy for diffuse parenchymal lung disease: a state-of-the-art review of procedural techniques, current evidence, and future challenges / R. J. Lentz, A. C. Argento, T. V. Colby, [et al.] // *Journal of Thoracic Disease*. – 2017. – Vol. 9. – № 7. – P. 2186-2203.

109. Transrectal high-intensity focused ultrasound for the treatment of localized prostate cancer: eight-year experience / T. Uchida, S. Shoji, M. Nakano, [et al.] // *International journal of urology*. – 2009. – Vol. 16. – № 11. – P. 881-886.

110. Transurethral bladder cryoablation in the porcine model / G. W. Hruby, F. Marruffo, J. Ortiz, [et al.] // *Urology*. – 2007. – Vol. 70. – № 2. – P. 391-395.

111. Transurethral needle ablation (TUNA): thermal gradient mapping and comparison of lesion size in a tissue model and in patients with benign prostatic hyperplasia / J. S. Rasor, A. R. Zlotta, S. D. Edwards, [et al.] // *European urology*. – 1993. – Vol. – 24. – № 3. – P. 411-414.

112. Ultrastructural studies of muscle cells and vascular endothelium immediately after freeze-thaw injury / W. D. Bowers, R. W. Hubbard, R. C. Daum, [et al.] // *Cryobiology*. – 1973. – Vol. 10. – № 1. – P. 9-21.

113. US characteristics of frozen prostate / G. Onik, C. Cobb, J. Cohen, [et al.] // *Radiology*. – 1988. – Vol. 168. – № 3. – P. 629-631.

114. Wang, A. X. Cryosurgical ablation for aged patients with severe benign prostate hyperplasia: a report of 21 cases / A. X. Wang, D. Wang, W. Tong // *National Journal of Andrology*. – 2007. – Vol. 13. – № 5. – P. 421-423.

115. Whittaker, D. K. Repeat freeze cycles in cryosurgery of oral tissues / D. K. Whittaker // *British Dental Journal*. – 1975. – Vol. 139. – № 12. – P. 459-465.

116. Williams, L. R. Reference values for resting blood flow to organs of man / L. R. Williams, R. W. Leggett // *Clinical Physics and Physiological Measurement*. – 1989. – Vol. 10. – № 3. – P. 187-217.

117. Woods, R. The physical and biological effects of high frequency sound waves of great intensity / R. Woods, A. Loomis // *Philos. Mag.* – 1927. – Vol. 4. – P. 414-336.

118. Xu, K. Modern Cryosurgery for Cancer / K. Xu, N. N. Korpan, L. Niu. – World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2012. – 940 p. – ISBN 978-981-4329-65-1.

119. Xylinas, E. Transurethral needle ablation Prostiva for treating symptomatic benign prostatic hyperplasia: a review / E. Xylinas, S. Le Gal, A. Descazeaud // Prog Urol. – 2010. – Vol. 20. – № 8. – P. 566-571.