

НАО «Карагандинский медицинский университет»

УДК 616.37-002; 615.832.9

На правах рукописи

АБРАМОВ ГРИГОРИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

**Влияние искусственной локальной гипотермии на динамику
морфологических изменений и биохимических показателей крови в
экспериментальной модели панкреонекроза**

6D110100 – Медицина

Диссертация на соискание степени доктора философии(PhD)

Научные консультанты:

Доктор медицинских наук, профессор
К.Т. Шакеев

Доктор медицинских наук, профессор
М.М. Тусупбекова

Кандидат медицинских наук,
ассоциированный профессор
О.А. Понамарева

MD, PhD
J.Alberton

Республика Казахстан
Караганда, 2025

Содержание

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	4
ОПРЕДЕЛЕНИЯ	5
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	6
ВВЕДЕНИЕ	7
1 МОДЕЛИРОВАНИЕ НЕКРОТИЧЕСКОГО ПАНКРЕАТИТА, МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ИСКУССТВЕННОЙ ЛОКАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ НА ТЕЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПАНКРЕОНЕКРОЗА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	11
1.2 Классификация острого панкреатита.....	14
1.3 Экспериментальные модели острого панкреатита	17
1.3.1 Неинвазивные модели острого панкреатита	17
1.3.2 Инвазивные модели острого панкреатита	20
1.4 Терапевтическая гипотермия (общая) и искусственная локальная гипотермия поджелудочной железы	24
1.5. Внеклеточные нуклеиновые кислоты – их патогенетическая и диагностическая роль при различных заболеваниях.....	31
1.6 Метаболиты пуринового обмена – их патогенетическая и диагностическая роль при заболеваниях поджелудочной железы.....	33
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	37
2.1 Общая характеристика исследования	37
2.2 Дизайн исследования	39
2.3 Методы исследования.....	42
2.3.1 Биохимические исследования крови.....	42
2.3.1.1 Определение концентрации катаболитов пуринового обмена в плазме крови.....	42
2.3.1.2 Определение концентрации внеклеточных нуклеиновых кислот в крови.....	42
2.3.1.3 Определение концентрации амилазы и липазы в сыворотке крови.	43
2.3.2 Морфологические исследования	43
2.3.3 Статистическая обработка результатов исследования.....	45
3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	46
3.1 Разработка экспериментальной модели панкреонекроза, индуцированного введением аутожелчи. Морфологическое исследование.....	46
3.2 Выбор охлаждающего агента для наложения искусственной локальной гипотермии (стендовый эксперимент).....	55
3.3 Искусственная локальная гипотермия поджелудочной железы аккумулятором холода на модели панкреонекроза	59
3.4 Сравнительная морфологическая характеристика состояния ткани поджелудочной железы при моделировании панкреонекроза	61

3.4.1 Морфологическая характеристика поджелудочной железы на модели панкреонекроза с введением аутожелчи в разные сроки эксперимента	62
3.4.2 Морфологическая характеристика поджелудочной железы на модели панкреонекроза с проведением искусственной локальной гипотермии в разные сроки эксперимента.....	65
3.4.3 Морфометрическая оценка структурных изменений поджелудочной железы на моделях панкреонекроза в группах с введением аутожелчи и с проведением искусственной локальной гипотермии в разные сроки эксперимента	69
3.5 Сравнительная макроскопическая характеристика поджелудочной железы при моделировании панкреонекроза с наложением искусственной локальной гипотермии.....	75
3.6 Сравнительная характеристика концентрации амилазы и липазы при моделировании панкреонекроза и наложении искусственной локальной гипотермии.....	82
3.7 Сравнительная характеристика концентрации внеклеточных нуклеиновых кислот плазмы и эритроцитов при моделировании панкреонекроза и наложении искусственной локальной гипотермии	84
3.7.1 Сравнительная характеристика концентрации внеклеточных нуклеиновых кислот в эритроцитах и плазме крови в группах панкреонекроз, гипотермия и SHAM попарно	87
3.8 Сравнительная характеристика концентрации пуринов плазмы крови и эритроцитов при моделировании панкреонекроза и с наложением искусственной локальной гипотермии	93
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	102
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	106
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	107
ПРИЛОЖЕНИЕ А	116
Решение Комитета по биоэтике НАО «Медицинский университет Караганды».....	116
ПРИЛОЖЕНИЕ Б	117
Акты внедрения результатов научно-исследовательской работы	117
ПРИЛОЖЕНИЕ В	119
Свидетельства о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты, охраняемые авторским правом	119

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:
ГОСТ 7.1-2003. Библиографическая запись. Библиографическое описание.

Общие требования и правила составления;

ГОСТ 7.32-2001 (изменения от 2006 г.). Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления;

Решение Комитета по биоэтике НАО «МУК» № 58 от 17.06.2019 года;

Постановление Правительства РК с изменениями и дополнениями от 07.08.2012г №1030, пункт 52. Утилизация лабораторных животных по окончании проведения лабораторных исследований;

Руководство Американской Ветеринарной Медицинской Ассоциации по эвтаназии животных: “AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition”.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В диссертации использованы следующие термины с соответствующими определениями:

Острый панкреатит – остро протекающее асептическое воспаление поджелудочной железы.

Панкреонекроз – острое деструктивное поражение поджелудочной железе, как осложнение панкреатита с развитием полиорганной недостаточности. **Терапевтическая гипотермия** – это управляемый метод лечения, направленное на снижение температуры тела.

Патоморфоз – изменение клинико-анатомической картины болезни под влиянием различных причин.

Искусственная локальная гипотермия – искусственная гипотермия с преимущественным охлаждением ограниченной области тела.

Аккумулятор холода – это водный раствор карбоксиметилцеллюлозы, обладающий большой теплоёмкостью

Внеклеточные нуклеиновые кислоты – высокомолекулярные органические соединения, биополимеры (полинуклеотиды), образованные остатками нуклеотидов, обнаруживаемые свободно циркулирующими в плазме крови или осажденными на эритроцитах.

Пурины – гетероциклические органические азотистые вещества, входящие в состав нуклеотидов и нуклеозидов. Они являются важными структурными элементами нуклеиновых кислот (ДНК, РНК), источников энергии (например, АТФ), ферментов (НАДФ, НАД, ФАД).

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АКС	– абдоминальный компартмент синдром
ДПК	– двенадцатиперстная кишка
ЖКБ	– желчнокаменная болезнь
ЖКТ	– желудочно-кишечный тракт
ЗГ	– зимогенные гранулы
ИЛГ	– искусственная локальная гипотермия
ОП	– острый панкреатит
КТ	– компьютерная томография
МРТ	– магнитно-резонансная томография
УЗИ	– ультразвуковое исследование
ПЖ	– поджелудочная железа
РКИ	– рандомизированное клиническое исследование
ССВО	– синдром системного воспалительного ответа
ТГ	– терапевтическая гипотермия
ХП	– хронический панкреатит
ЭП	– экспериментальный панкреонекроз
ЭРХПГ	– эндоскопическая ретроградная холангиопанкреатография
ПН	– панкреонекроз
вкНК	– внеклеточные нуклеиновые кислоты
КРФ	– кислоторастворимая фракция белков крови
вкДНК	– внеклеточные дезоксирибонуклеиновые кислоты
вкРНК	– внеклеточные рибонуклеиновые кислоты

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Несмотря на внедрение в клиническую практику высокоинформативных методов исследования при острых панкреатитах (ОП) и панкреонекрозах (ПН), использование эффективных терапевтических методов, частота неудовлетворительных результатов лечения данной категории больных указывает на нерешенность данной проблемы [1].

Даже использование миниинвазивных лапароскопических методов оперативного лечения не позволило снизить частоту летальных исходов. Комплексная консервативная терапия при острых формах панкреатита и панкреонекроза не всегда останавливает деструктивные процессы.

Анализ данных литературы свидетельствует, что заболеваемость острым панкреатитом остается на прежнем уровне и варьирует от 20 до 80 пациентов на 100 тыс. населения в год. За последние годы во всем мире прослеживается динамика к увеличению числа пациентов с острым панкреатитом, который занимает 3 место среди острых хирургических заболеваний, уступая место лишь аппендициту и холециститу [2,3]. Деструктивные формы острого панкреатита, по данным разных авторов, наблюдается у 20-44% больных, вызывая органную недостаточность со смертностью до 30-47% [4,5].

В проведенном анализе острых хирургических заболеваний органов брюшной полости с 1998 по 2018 год в Казахстане, число пациентов с острым панкреатитом находится на 3 месте. При этом послеоперационная летальность до 6 часов составляет 18,8%, от 6 до 24 часов 26,9%, позже 24 часов 33,6%. [6]

Во многом остается дискуссионной тактика для выбора консервативного и хирургического лечения различных форм заболевания, отдельные лечебные мероприятия нуждаются в правильной оценке их эффективности. Проблема летальности от деструктивных форм острого панкреатита имеет социальный характер, так как основным контингентом этих больных являются пациенты в трудоспособном возрасте [7,8].

Неудовлетворенность результатами лечения ОП, ставит задачу поиска новых лекарственных средств и методов лечения, позволяющих более эффективно останавливать прогрессирование деструктивного процесса в поджелудочной железе.

На сегодняшний день нет сформированного единого мнения об эффективности соматостатина и его аналогов при лечении острого панкреатита. Эти препараты не нашли широкого применения, так как угнетают висцеральный кровоток и моторику кишечника, так и не снижают частоту летальных исходов при остром панкреатите и панкреонекрозе. Так, соматостатин и его аналоги были проверены на нескольких экспериментальных моделях ОП, с противоречивыми, иногда отрицательными, и иногда положительными результатами. Более того в проведенных РКИ, включавших 302 пациентов с тяжелым острым панкреатитом, не показало существенного различия относительно летальности, частоты осложнений от ОП.

Одним из методов лечения острого панкреатита и панкреонекроза является проведение искусственной локальной гипотермии (ИЛГ). На основании

клинического и экспериментального опыта доказано, что гипотермия поджелудочной железы тормозит выработку ферментов экзокринным аппаратом, что является фактором прерывания патологического процесса. Данный метод хорошо изучен В.И. Шапошниковым и соавторами, на каналикулярно-гипертензионной модели деструктивного панкреатита на собаках, описанный В.С. Савельевым. Гипотермию поджелудочной железы производили с помощью орошения хлорэтилом или наложением тающего льда у животных с деструктивным панкреатитом суточной давности. Определяли толщину железы, уровень сывороточной альфа-амилазы, трипИЛГсин-ингибирующую активность, уровень катионных белков нейтрофильных лейкоцитов до наложения гипотермии и после нее. После завершения охлаждения измеряли температуру ПЖ. После измерения температуры ПЖ животное усыплялось [9]. Однако в этой работе не рассматривается влияние ИЛГ на течение экспериментального панкреонекроза. В связи с чем, предоставляется важным изучить её в эксперименте.

Патогенетически направленный метод лечения приводит к прерыванию цепи патологического процесса и изменению клинико-анатомической картины заболевания, который может быть зарегистрирован морфологическими тестами или результатами клинических и лабораторных анализов.

Данная работа посвящена изучению влияния ИЛГ на течение экспериментального панкреонекроза, путем проведения морфологической оценки. Отличается от ранее цитируемой работы В.И. Шапошникова тем, что ИЛГ производится сразу после введения аутожелчи в паренхиму железы, и наблюдается её влияние на течение экспериментального панкреонекроза в течение первых 2-х суток.

Цель исследования - изучить влияние искусственной локальной гипотермии на течение панкреонекроза в эксперименте.

Задачи исследования:

1. Разработать экспериментальную модель панкреонекроза у лабораторных животных (кроликов) для изучения влияния локальной гипотермии на развитие некротического панкреатита.
2. Провести сравнительную характеристику охлаждающих агентов в стендовом эксперименте на биологических тканях.
3. Разработать методику интраоперационного применения искусственной локальной гипотермии у лабораторных животных.
4. Определить влияние искусственной локальной гипотермии на течение экспериментального панкреонекроза на основании морфологических исследований тканей поджелудочной железы.
5. Изучить влияние искусственной локальной гипотермии на динамику изменений внеклеточных нуклеиновых кислот и пуринов в крови лабораторных животных на экспериментальной модели панкреонекроза.

Научная новизна

Разработана модель панкреонекроза у кроликов (свидетельство о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты, охраняемые авторским

правом № 7190 от 23.12.2019 года «Моделирование панкреонекроза в эксперименте») (Приложение В);

Определен оптимальный охлаждающий агент для наложения интраоперационной искусственной локальной гипотермии (свидетельство о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты, охраняемые авторским правом № 14050 от 23.12.2020 года «Выбор наиболее эффективного охлаждающего агента методом определения показателей температурного поля в стендовом эксперименте») (Приложение В);

Разработана методика проведения интраоперационной локальной гипотермии в эксперименте (свидетельство о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты, охраняемые авторским правом № 14953 от 08.02.2021 года «Методика проведения интраоперационной искусственной локальной гипотермии при панкреонекрозе в эксперименте на животных») (Приложение В);

На оригинальной модели панкреонекроза показано влияние искусственной локальной гипотермии на снижение уровня внеклеточных ДНК в плазме крови.

Практическая значимость работы

Разработанная модель панкреонекроза может быть использована в различных экспериментальных исследованиях для изучения основных патогенетических механизмов развития заболевания и его осложнений.

Результаты исследования позволяют рекомендовать аккумулятор холода (карбоксиметилцеллюлозу), как эффективный и доступный охлаждающий агент.

По результатам исследования можно сделать вывод о том, что искусственная локальная гипотермию может быть использована для абортирования процесса некроза поджелудочной железы в эксперименте.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработанная модель панкреонекроза путем введения аутожелчи в паренхиму поджелудочной железы проста в исполнении, выполняется с меньшей хирургической агрессией на иные ткани брюшной полости, хорошо воспроизводится с получением стандартного результата.

2. Наиболее оптимальным холододовым агентом для оценки терапевтического эффекта гипотермии на течение экспериментального панкреонекроза определен аккумулятор холода карбоксиметилцеллюлоза, в связи с его свойством поддерживать низкую температуру в месте наложения более 15 минут.

3. Методика интраоперационного наложения искусственной локальной гипотермии путем погружения охлаждающего агента в брюшную полость с динамической внутрибрюшной термометрией проста и эффективна, исключает инфицирование брюшной полости за счет использования стерильных контейнеров, а сама процедура охлаждения полностью атравматична.

4. Наложении искусственной локальной гипотермии после введения желчи в паренхиму поджелудочной железы приводит к абортированию некротических

процессов в поджелудочной железе в независимости от срока завершения эксперимента.

5. Использование искусственной локальной гипотермии положительно влияет на сохранение регенераторного потенциала тканей поджелудочной железы, оцененного на основании отсутствия повышения уровня внеклеточных ДНК в плазме крови экспериментальных животных.

Внедрение результатов исследования

Методика проведения интраоперационной искусственной локальной гипотермии, экспериментальная модель панкреонекроза у кроликов внедрена на кафедре биомедицины и в лаборатории коллективного пользования научно-исследовательского центра Карагандинского медицинского университета. Внедрение результатов подтверждено актами о внедрении (Приложение Б).

Личный вклад автора. Автором разработана экспериментальная модель панкреонекроза, разработана методика проведения интраоперационной искусственной локальной гипотермии, выполнена экспериментальная часть исследования, проведен забор материалов для гистологического и биохимического исследований. Самостоятельно проведен сбор и обработка материала, анализ, обобщение результатов исследования и их описание, написаны все главы диссертационной работы. Материал обработан и проанализирован лично автором в объеме 80%.

Апробация работы

Основные положения исследования доложены на научно-практической конференции молодых ученых «PhD Scientific Day», посвященной 100-летию со дня рождения Б.А. Атчабарова (Караганда, 2019 год); на заседании комитета по биоэтике (протокол №20, от 17.06.2019 г.), на расширенном заседании института наук о жизни (протокол №5 от 27.12.2024 г.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 8 научных работ, из них: 2 публикации в международных научных изданиях, входящих в информационную базу данных Scopus; 3 публикации в научных изданиях Казахстана, рекомендованных на момент публикации Комитетом по контролю в сфере образования и науки МОН РК; 3 свидетельства о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты, охраняемые авторским правом.

Структура и объем диссертации

Язык изложения материала диссертации – русский. Работа включает в себя такие разделы, как введение, основная часть из трех разделов, заключение с выводами и список использованных в работе источников, состоящий из 137 источников. Диссертация состоит из 121 страницы печатного компьютерного текста, включает 15 таблиц, 57 рисунков, 3 приложения.

1 МОДЕЛИРОВАНИЕ НЕКРОТИЧЕСКОГО ПАНКРЕАТИТА, МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ИСКУССТВЕННОЙ ЛОКАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ НА ТЕЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПАНКРЕОНЕКРОЗА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Острый панкреатит – асептическое воспалительное заболевание поджелудочной железы, вовлекающий в патологический процесс окружающую забрюшинную клетчатку, брюшную полость и органы внебрюшинной локализации, в основе которых лежат аутоферментативные процессы. Анализ литературы свидетельствует, что заболеваемость острым панкреатитом во всем мире остается на высоком уровне и варьирует от 33 до 74 случаев на 100 тыс. населения в год, смертность от 1 до 60 случаев на 100 тыс. населения год [10], занимая 2 место среди острых хирургических заболеваний. За последние годы отмечается снижение общей летальности с 4,0%-4,5% до 2,5%-3,5%, однако послеоперационная летальность остается на прежнем уровне 20%-25% [11, 12, 13, 14].

Отмечен тот факт, что заболеваемость и смертность от острого панкреатита выше в Америке по сравнению с Европейскими странами. В европейских странах заболеваемость острым панкреатитом также колеблется от 4,6 до 100 случаев на 100 тыс. населения [15], в Китае от 30,5 до 39,2 случаев на 100 тыс. населения в год. В Казахстане распространенность острого панкреатита в общем пуле пациентов с хирургической патологией составляет от 10 до 13% [16]. Причем доля пациентов с деструктивными формами острого панкреатита варьируется в пределах от 15 до 20% [17].

Этиология острого панкреатита исследуется в течение нескольких веков. В 1856 году Клауд Бернард предложил, что рефлюкс желчи в общий панкреатический проток может индуцировать развитие острого панкреатита [18]. В 1889 году Реджинальд Фитц описал множество современных клинических и патогенетических характеристик острого панкреатита [19]. В 1901 году Юджин Опи написал о взаимосвязи между желчекаменной болезнью и панкреатитом, и выдвинул теорию, что прохождение камня в общий желчный проток является ведущей причиной развития острого панкреатита [20].

В 1917 году отмечено, что алкоголь является важным патогенетическим фактором в развитии воспаления в поджелудочной железе [21]. Проведение эндоскопической ретроградной холангиопанкреатографии имеет потенциальный риск развития острого панкреатита. Также известными факторами развития острого панкреатита являются внутрипротоковая папиллярная опухоль поджелудочной железы

Злоупотребление алкоголем и желчнокаменная болезнь являются давно известными факторами риска, однако, на сегодняшний день известны новые причины развития заболевания, которые наряду с новыми аспектами патофизиологии улучшают понимание заболевания. По мере того, как заболеваемость и частота госпитализации острого панкреатита увеличивается, растет потребность в эффективном лечении.

Одним из факторов развития острого панкреатита и ухудшающий прогноз лечения является курение. Во многих крупных проспективных исследованиях сообщается что, метаболиты от сигаретного дыма, а именно никотин и NNK (никотинпроизводный нитрозамин-кетон), способны вызывать функциональные и гистологические изменения в поджелудочной железе. Основным их механизмом действия является влияние на секрецию ацинарных клеток поджелудочной железы и зимогенов через никотиновые преганглионарные рецепторы. Воздействие на микроваскуляризацию поджелудочной железы проходит через путь окиси азота (эндотелиальный сосудорасширяющий фактор, приводит к вазодилатации). Есть косвенные данные что, никотин и акролеин приводят к дисфункции гена CTFR, тем самым влияя на протоковую секрецию. [22]. В литературе есть данные, что сбой в работе звездчатых клеток поджелудочной железы может привести к развитию панкреатита и раку поджелудочной железы. Но влияние метаболитов сигаретного дыма на звездчатые клетки и островки требует дальнейшего изучения [23].

Гистологически острый панкреатит можно классифицировать как интерстициальный отек, или как некроз, в зависимости от воспалительных изменений в паренхиме железы. В международном симпозиуме по острому панкреатиту в 1992 году дано определение некрозу поджелудочной железы, как один или несколько диффузных, или фокальных участков нежизнеспособной ткани поджелудочной железы [24].

Некроз поджелудочной железы определяется во время операции или на аутопсии. Диагностируется некроз поджелудочной железы с помощью компьютерной томографии брюшной полости с внутривенным контрастированием. Поскольку нормальная микроциркуляция поджелудочной железы нарушается во время острого некротизирующего панкреатита, пораженные участки железы не показывают нормального усиления контраста. Отсутствие нормального усиления контраста может быть лучше выявлено через несколько дней после первоначального клинического проявления. Компьютерная томография брюшной полости с контрастированием является золотым стандартом неинвазивной диагностики некроза поджелудочной железы, с точность более 90%, при некрозе паренхимы железы более чем 30% [25].

Клиническое течение острого панкреатита разделяется на среднетяжелый (mild) и тяжелый (severe). Тяжелый панкреатит обычно является результатом некроза поджелудочной железы. Заболеваемость и смертность от острого панкреатита выше, когда железа подвергается некрозу, особенно когда пораженный участок инфицируется [26]. Важно выявить пациентов с некрозом поджелудочной железы, для того чтобы предпринять соответствующее лечение. В последние годы тактика ведения этих пациентов перешло с раннего хирургического вмешательства (некрэктомия), к интенсивной терапии, с особыми критериями оперативного и консервативного ведения пациента [27].

Во многом остается дискуссионной тактика для выбора консервативного и хирургического лечения различных форм заболевания, отдельные лечебные мероприятия нуждаются в правильной оценке их эффективности.

Общая летальность от тяжелого острого панкреатита составляет 30%. Летальный исход разделяется на 2 этапа. Ранняя смерть наступает на 1-2 недели после начала заболевания, и связана с мультисистемной органной недостаточностью, вызванная высвобождением медиаторов воспаления и цитокинов. Поздняя смерть является результатом местной инфекции или сепсиса. Пока острый некротизирующий панкреатит остается стерильным, общая смертность составляет примерно 10%. Инфицирование увеличивает смертность в 3 раза [28].

Во время ведения пациента могут возникнуть местные и системные осложнения острого некротизирующего панкреатита. Системные осложнения включают в себя острый респираторный дистресс-синдром, острую почечную недостаточность, шок, коагулопатию, гипергликемию и гипокальциемию. Местными осложнениями являются желудочно-кишечные кровотечения, инфицированный некроз, и некроз прилежащей кишки. Поздними местными осложнениями являются абсцесс поджелудочной железы и псевдокисты.

Клинически трудно различить стерильный панкреатит от инфицированного, так как в обоих случаях присутствует лихорадка, лейкоцитоз и сильные боли в животе. Своевременная диагностика инфицированного некротизирующего панкреатита предоставляется очень важным, так как без вмешательства показатель смертности достигает 100%.

Заболеваемость и смертность от острого панкреатита в значительной степени определяется уровнем недостаточностью отдаленных органов при тяжелых приступах. Считается, что эти системные проявления заболевания, первоначально ограниченного поджелудочной железой, являются результатом активирования различных провоспалительных и противовоспалительных медиаторов высвобождаемых из поджелудочной железы, различными другими органами в течение заболевания. Исследованиями показано, что эти медиаторы продуцируются в различных тканях в определенной последовательности, инициируемые локальным высвобождением провоспалительных медиаторов, таких как IL-1 β , IL-6 и IL-8, которые вызывают системное воспаление и приводит к воспалительной инфильтрации отдаленных органов с полиорганной недостаточностью и смертью [29].

Авторами доказано, что в развитии деструктивных процессов важную роль играет колокализация пищеварительных ферментов и лизосомальной гидролазы, что дает пуск для активации пищеварительных ферментов в интраацинарной клетке [30].

Системные проявления острого панкреатита являются причиной смерти в большинстве случаев, и это связано с действием специфических воспалительных цитокинов. В источниках, в которых изучались сообщения по поводу вовлечения цитокинов в клинический и экспериментальный панкреатит, отмечено, что некоторые цитокиновые и другие медиаторы воспаления быстро

продуцируются во время острого панкреатита. Эти медиаторы возникают во многих тканях независимо от модели экспериментального панкреатита и этиологии заболевания у человека. Предотвращение деятельности этих медиаторов оказывает благотворное влияние на течение панкреатита у экспериментальных животных.

1.2 Классификация острого панкреатита

В настоящее время в связи с полученными данными, позволившими более глубоко понять патофизиологию острого панкреатита, панкреонекроза, органной недостаточности и их исходов, а также развитие визуальной диагностики, обусловили необходимость пересмотра ранее озвученной классификации Атланты 1992 года. В пересмотренной классификации острого панкреатита 2012 года выделены 2 фазы заболевания: ранняя и поздняя [31]. Тяжесть заболевания классифицируется как легкая, средняя и тяжелая. Острый панкреатит легкой степени тяжести, наиболее распространенная форма, не имеет органной недостаточности, местных или системных осложнений и обычно разрешается в первую неделю. Острый панкреатит средней степени тяжести определяется преходящей органной недостаточностью, местными осложнениями или обострениями сопутствующих заболеваний. Острый панкреатит тяжелой степени тяжести характеризуется стойкой органной недостаточностью, то есть органной недостаточностью более 48 часов. Местными осложнениями являются скопление жидкости, некроз паренхимы и околопанкреатической клетчатки (стерильный или инфицированный).

Постановка диагноза

Для постановки диагноза острого панкреатита требуется 2 признака из 3-х: (1) абдоминальная боль, характерная острому панкреатиту (острое начало, стойкая, опоясывающий характер); (2) активность липазы сыворотки крови (или амилазы), по крайней мере, в 3 раза превышающая верхнюю границу нормы; (3) визуальная диагностика при компьютерной томографии с контрастированием, МРТ или УЗИ [32-35]. Начало острого панкреатита определяется как время возникновения болей в животе, а не время поступления в стационар.

Определение вида острого панкреатита

Острый панкреатит делится на 2 вида: интерстициальный отечный панкреатит и панкреонекроз.

Интерстициальный отечный панкреатит

У большинства пациентов наблюдается диффузное увеличение поджелудочной железы вследствие воспалительного отека. На КТ с контрастированием отмечается однородное усиление рисунка паренхимы поджелудочной железы, в перипанкреатической клетчатке визуализируется некоторые воспалительные изменения, может быть небольшое количество жидкости. Клинические симптомы отечного панкреатита обычно разрешаются в течение первой недели [36].

Панкреонекроз

Примерно у 5-10% больных развивается некроз паренхимы поджелудочной железы и/или перипанкреатической клетчатки. Нарушение перфузии паренхимы железы и признаки перипанкреатического некроза развиваются в течение нескольких дней [37-41], что объясняет неинформативность КТ на ранних стадиях. В первые несколько дней КТ картина перфузии поджелудочной железы может быть неоднородной, с переменным ослаблением до того, как область поражения станет более разграниченной.

Инфицированный панкреонекроз

Панкреонекроз может оставаться стерильным или инфицироваться, большинство данных свидетельствует, что нет корреляции между степенью некроза, риском инфицирования и длительностью симптомов [42-45]. Своевременная диагностика инфицированного панкреонекроза очень важна, так как требует антибиотикотерапии и хирургического вмешательства.

Осложнения острого панкреатита

Органная недостаточность. Для того, чтобы установить органную недостаточность, необходимо оценить 3 системы с использованием оценочной шкалы Маршалла: дыхательную, сердечно-сосудистую, почечную.

Местные осложнения: скопление жидкости, псевдокиста поджелудочной железы, некроз перипанкреатической клетчатки. К другим местным осложнениям острого панкреатита относятся дисфункция пилорического отдела желудка, тромбоз селезенки и воротной вены, некроз толстой кишки. Местные осложнения следует подозревать при персистировании или рецидиве болей в животе, вторичном повышении панкреатических ферментов в сыворотке крови, нарастании органной дисфункции и/или развитии клинических признаков сепсиса.

Системные осложнения

Обострения сопутствующей патологии таких как, ишемическая болезнь сердца, хроническая болезнь легких, являются системными осложнениями.

Фазы острого панкреатита

Острый панкреатит протекает в 2 фазы, с двумя пиками смертности, ранней и поздней [46]. За ранней фазой, которая обычно длится одну неделю, следует поздняя фаза, которая может длиться от нескольких недель до нескольких месяцев.

Ранняя фаза

На ранней стадии системные нарушения возникают в результате ответа на локальное повреждение поджелудочной железы. Ранняя фаза обычно заканчивается к концу первой недели, но может продолжаться и во второй неделе. В ответ на воспаление поджелудочной железы активируются цитокиновые каскады, которое клинически проявляется как синдром системного воспалительного ответа (ССВО) [47]. При персистирующем ССВО существует риск развития органной недостаточности. Определяющим фактором тяжести острого панкреатита на ранней стадии, прежде всего,

является наличие и длительность органной недостаточности. Если органная недостаточность длится менее 2-х суток, то она называется преходящей, если продолжается более 2-х суток, носит характер стойкой органной недостаточности. Если органная недостаточность затрагивает более чем одну систему органов, она называется полиорганной недостаточностью.

Несмотря на то, что местные осложнения могут быть диагностированы на ранней фазе, они не являются показателями тяжести заболевания. Кроме того, степень морфологических изменений не прямо пропорционально тяжести органной недостаточности. Поэтому определение тяжести острого панкреатита на ранней стадии зависит от наличия или длительности органной недостаточности.

Поздняя фаза

Поздняя фаза характеризуется сохранением признаков системного воспаления и наличием местных осложнений, поэтому поздняя фаза встречается только у больных с панкреатитом средней и тяжелой степенью тяжести. Важно различать характер местного осложнения, поскольку эти осложнения могут иметь различную тактику ведения пациента.

Определение степени тяжести острого панкреатита

Определение и стратификация степени тяжести острого панкреатита очень важна. Во-первых, при поступлении в стационар важно выявить пациентов с тяжелым острым панкреатитом, которые нуждаются в интенсивной терапии. Во-вторых, клиницисты должны уметь выявлять тех пациентов, которым требуется помощь в специализированных центрах. В-третьих, для специалистов в специализированных центрах деление таких пациентов на подгруппы в зависимости от наличия стойкой органной недостаточности, местных или системных осложнений дает определенные преимущества в стратификации.

Острый панкреатит легкой степени тяжести

Характеризуется отсутствием органной недостаточности, местных или системных осложнений. Пациенты обычно выписываются в ранние сроки, не требует проведения КТ исследования.

Острый панкреатит средней степени тяжести

Характеризуется преходящей органной недостаточностью, местными или системными осложнениями, при отсутствии стойкой органной недостаточности. Редко требует хирургического вмешательства.

Острый панкреатит тяжелой степени тяжести

Характеризуется стойкой органной недостаточностью, развивающейся в первые недели заболевания. Активация цитокиновых каскадов приводит к развитию ССВО. Пациенты, у которых развивается стойкая органная недостаточность в течение первых нескольких дней заболевания, имеют повышенный риск смерти, которая достигает 36-50% [48].

Переоценку степени тяжести острого панкреатита следует проводить через 24ч, 48ч и 7 дней после поступления в стационар.

Псевдокиста поджелудочной железы

Это скопление жидкости в перипанкреатических тканях (иногда частично или полностью внутри поджелудочной железы). Она окружена хорошо выраженной стенкой. Развивается при нарушении целостности стенки основного панкреатического протока или её ветвей, без некроза паренхимы поджелудочной железы. Эта теория предполагает, что последующая утечка панкреатического сока, приводит к постоянному локализованному сбору жидкости. Когда в полости заполненной жидкостью находится явный твердый некротический материал, данный термин использовать не следует. Развитие псевдокисты поджелудочной железы крайне редко встречается при остром панкреатите. В 50% случаев псевдокиста поджелудочной железы развивается после некрэктомии.

1.3 Экспериментальные модели острого панкреатита

Экспериментальные модели острого панкреатита на животных являются инструментом для углубления понимания сложных механизмов патофизиологии заболевания и разработки новых стратегий лечения. В настоящее время существует много моделей острого панкреатита. Их можно разделить на инвазивные и неинвазивные модели, в зависимости от метода индукции. Идеальная модель острого панкреатита должна включать в себя несколько свойств. Она должна быть легко воспроизводима, с возможностью варьировать тяжесть заболевания в соответствии с целью исследования. Морфологическая картина и патофизиология должна соответствовать человеческой картине заболевания.

1.3.1 Неинвазивные модели острого панкреатита

Модель, индуцированная введением гормонов

Церулеин был успешно использован для того, чтобы вызвать острый панкреатит у крыс [49], мышей, собак, хомяков. Острый панкреатит может быть вызван внутривенным, подкожным или внутрибрюшинным методом введения. Используя этот метод, секреция протеолитических ферментов может быть увеличен до уровня, вызывающим ацинарный аутолиз поджелудочной железы. Предпочтительным методом является внутривенное введение. Он позволяет точно контролировать скорость инфузии, а значит, контролировать сроки и тяжесть острого панкреатита. Преимуществом данной модели является в том, что она относительно проста и недорога в исполнении. К недостаткам этой модели относится, несмотря, на введение максимальных доз церулеина, развивается только острый панкреатит легкой степени тяжести.

Модель, индуцированная алкоголем

Воздействие этанола на поджелудочную железу было исследовано в нескольких исследованиях на животных с целью изучения основных патофизиологических механизмов, приводящих к алкогольному панкреатиту. Существующие модели, индуцированные алкоголем, относительно просты и

недорогие. Однако воспроизводимость этой модели низкая, и нет корреляции с клиническим течением острого панкреатита.

Модели нокаута гена

Модели нокаута гена все чаще используются для изучения этиологии и течения острого панкреатита. Преимуществом данной модели заключается в том, что при удалении интересующего гена, его функция и роль могут быть уточнены. Кроме того, не используются фармакологические препараты, которые могут давать побочные эффекты. В целом модель нокаута гена является трудоемкой, дорогостоящей, сложной для воспроизведения. А также, любая экстраполяция экспериментальных данных из модели нокаута гена на человека затруднена.

Модель, индуцированная диетой

Преимуществом моделей, основанной на диете, заключается в том, что она возможно является самой простой для исследования острого геморрагического панкреатита. Она дешевая, хорошо воспроизводимая и не требует хирургических вмешательств. Кроме того, ограничивая период кормления, можно контролировать уровень смертности на любом желаемом уровне от 0% до 100% [50]. Модель пригодна для изучения патофизиологических аспектов заболевания и потенциальной пользы экспериментального лечения путем измерения выживаемости, измерения биохимических параметров и гистологической картины. По сравнению с моделью с использованием церулеина, эта модель создает некроз поджелудочной железы с летальным исходом. Несмотря на то, что морфологические изменения имеют много сходство с человеческой, значимость для этиологии заболевания сомнительна. Кроме того, модель, основанная на диете, является видоспецифичной и может использоваться только у мышей.

Модель, с использованием L-аргинина

Эта модель вызывает панкреонекроз при введении большой дозы L-аргинина, смертность составляет 2,5%. Преимуществом данной модели заключается в высокой воспроизводимости и в возможности достигать эффекта в зависимости от введенной дозы L-аргинина. Она хорошо подходит для исследования ранних и поздних фаз острого панкреатита.

Таблица 1 – Основные преимущества и недостатки неинвазивных моделей ОП

Модель	Преимущества	Недостатки	Клиническая значимость
Гормон-индуцированная	<ul style="list-style-type: none"> • Вызывает острый панкреатит у разных животных: у крыс, мышей, собак, хомячков; • Можно 	<ul style="list-style-type: none"> • Развивается только острый панкреатит легкой степени тяжести • Низкий процент смертности 	<ul style="list-style-type: none"> • Повреждения легких у крыс напоминает ранние стадии респираторного-дисстресс-синдрома

	<p>индуцировать различными методами введения: внутривенно, подкожно, внутрибрюшинным;</p> <ul style="list-style-type: none"> • Позволяет контролировать сроки и тяжесть острого панкреатита; • Подходить для изучения эндокринных взаимодействий секретина с холецистокинина. • Простота выполнения, недороговизна 	<ul style="list-style-type: none"> • Высокая вариабельность тяжести и течения заболевания 	<p>у взрослых</p> <ul style="list-style-type: none"> • Структурные изменения в ацинусах поджелудочной железы сходны с человеческой
Алкоголь-индуцированная	<ul style="list-style-type: none"> • Полезна для изучения микроциркуляции поджелудочной железы, под влиянием свободных кислородных радикалов генерированные алкоголем. • Можно применять у различных животных: крыс, мышей, собак • Проста в выполнении, и недороговизна 	<ul style="list-style-type: none"> • Экспериментальные модели, с использованием только этанола, не приводят к образованию некроза поджелудочной железы. • Низкая воспроизводимость 	<p>Отсутствует корреляция с клиническими данными</p>
Индуцированная диетой	<ul style="list-style-type: none"> • Простейший способ исследования геморрагического панкреатита; • Дешевый, высоко воспроизводимый; • Отсутствие хирургического 	<ul style="list-style-type: none"> • Видоспецифичность – можно применять только у мышей, чей малый размер вызывает технические трудности; • Специфичность 	<ul style="list-style-type: none"> • Развивается тяжелый панкреонекроз, который сходный с человеческим; • Гистологическая картина панкреатического и

	вмешательства; • Можно контролировать уровень смертности, изменяя период кормления	пола – только у самок; • Вариабельное начало острого панкреатита; • Требуется тщательный контроль для обеспечения того, чтобы диета была одинаковой в разных экспериментальных группах	перипанкреатического воспаления, а также клиническое течение и биохимические данные сходны с человеческим; • Развивается асцит, ацидоз, гипоксия, гиповолемический шок сходный с человеческим.
Нокаут гена	• Полезна для изучения функции интересующего гена; • Отсутствие использования фармакологических препаратов	• Длительный, дорогой, сложный в воспроизведении • Мутация может стимулировать непредвиденные фенотипические изменения	• Сложность в экстраполяции данных на человека
L-Аргинин индуцированная	• Высокая воспроизводимость; • Способность достигать эффекта в зависимости от введенной дозы; • Полезна для изучения экстрапанкреатических изменений.	• Длительное назначение L-аргинина приводит к развитию хронического панкреатита	• Развитие полиорганной недостаточности существенно влияет на заболеваемость на смертность от острого панкреатита

1.3.2 Инвазивные модели острого панкреатита

Высокая вариабельность тяжести острого панкреатита связанные, с неинвазивными экспериментальными моделями, а также нечеткая временная связь начало заболевания, привели к разработке инвазивных моделей для преодоления этих проблем.

Модель закрытой двенадцатиперстной петли

Эта модель, предложенная Preferr at all. в 1957 году, заключается в закрытии выше и ниже сосочка ДПК. Признаки панкреонекроза развивались в течение 9-11 часов. Механизм острого панкреатита связан с рефлюксом содержимого ДПК в панкреатический проток. Поскольку постоянная перевязка

ДПК часто приводило к смерти животного, некоторые исследователи предприняли попытку временной перевязки ДПК у крыс. Это позволило изучить прогрессирование острого панкреатита и применить методы лечения. Данная модель помогла решить некоторые вопросы, касающиеся этиологии, в частности роли дуоденального рефлюкса в патогенезе заболевания. Считается что это модель, очень похожа на ситуацию у тех пациентов, у которых развивается острый панкреатит в сочетании с обструкцией афферентной петли после гастрэктомии по Бильрот II.

Модель антеградной перфузии панкреатического протока

Преимущество данной модели заключается в её надежности и воспроизводимости. Тяжесть острого панкреатита может варьироваться, в зависимости от объема и перфузионного давления.

Модель инъекции билиопанкреатического протока

После дуоденотомии, инъекция солей желчи в панкреатический проток приводит к панкреонекрозу. Почти любое средство, введенное в панкреатический проток под давлением, вызывает острый панкреатит у лабораторных животных, таких как собаки и крысы. Одним из лучших таких средств является таурохолат натрия. Основные преимущества и недостатки модели описаны в таблице №2.

Комбинация секреторной гиперстимуляции с введением желчных кислот в панкреатический проток

Эта модель заключается во введении гликодезоксихолевой кислоты в проток и внутривенным введением церулеина. Сочетание обоих препаратов вызывает острый панкреатит более надежно, чем индукция одним компонентом. Эта модель повреждает поджелудочную железу однородно, вызывая острый панкреатит средней степени тяжести.

Сосудистая модель

Клинические синдромы, связанные с нарушением микроциркуляторного русла, редко являются причиной острого панкреатита у человека. Узелковый периартериит, микрососудистые тромбозы, ишемия или окклюзия сосудов, кровоснабжающих поджелудочную железу, могут быть причиной острого панкреатита в редких случаях. Исследователями были разработаны различные модели для изучения сосудистого механизма, вызывающий острый панкреатит.

Нарушения в микроциркуляторном русле являются грозным осложнением при тяжелом остром панкреатите. Экспериментальные данные показали, что нарушения микроциркуляции инициируют не только локальное повреждение, но и повреждение отдаленных органов. Таким образом, считается, что микроциркуляторные нарушения играют важную роль в развитии синдрома полиорганной недостаточности [51].

Имеются экспериментальные данные о том, что нарушения микроциркуляции не только связаны со снижением каиллярного кровотока, но и с усилением взаимодействия лейкоцитов с эндотелием и повышением проницаемости капилляров [52]. Высокая проницаемость капилляров представляет собой актуальную клиническую проблему.

Исследователями предпринимались различные попытки по созданию сосудистой модели острого панкреатита. Так, в 1986 году Спорман и др. производили окклюзию чревного ствола и верхней брыжеечной артерии в течение 20 минут. В другом исследовании Преферр и др. произвели перевязку верхней поджелудочно-двенадцатиперстной артерии. В целом, сосудистые модели острого панкреатита не являются полезным для изучения острого панкреатита.

Модели с перевязкой протоков

Острый панкреатит может быть вызван после перевязки дистального отдела общего желчевыводящего протока. Модели с перевязкой протоков были разработаны для воспроизведения клинической ситуации с обструкцией желчными камнями, нарушением моторики сфинктера, новообразованиями, паразитами, поражающий терминальный отдел билиопанкреатического протока.

Таблица 2 – Основные преимущества и недостатки инвазивных моделей ОП

Модель	Преимущества	Недостатки	Клиническая значимость
Закрытой двенадцатиперстной петли	<ul style="list-style-type: none"> • Простой в выполнении, воспроизводимый • Полезна для изучения роли дуоденального рефлюкса в патогенезе заболевания 	<ul style="list-style-type: none"> • Требуется хирургическое вмешательство; • Давление, которое создается в закрытой двенадцатиперстной петле не физиологична 	<ul style="list-style-type: none"> • Сходство с пациентами у которых развивается острый панкреатит после гастрэктомии по Бильрот II
Антеградная перфузия панкреатического протока	<ul style="list-style-type: none"> • Полезна для изучения ранних патофизиологических событий и последующего прогрессирования заболевания • Воспроизводимый • Тяжесть панкреатита можно варьировать в зависимости от перфузионного давления 	<ul style="list-style-type: none"> • Необходимость канюлирования панкреатического протока и контролировать перфузионное давление • Требуются крупные животные 	<ul style="list-style-type: none"> • Этиология и морфологические изменения сопоставимы с человеческой

	<ul style="list-style-type: none"> • Идеально подходит для оценки терапевтических эффектов фармакологических препаратов 		
Инъекция билиопанкреатического протока	<ul style="list-style-type: none"> • Подходит для изучения системных нарушений при остром панкреатите • Полезна для изучения образования псевдокист, абсцесса поджелудочной железы 	<ul style="list-style-type: none"> • Трудно установить степень variability в отношении некроза тканей и выживаемости животных 	<ul style="list-style-type: none"> • Клиническая и патогенетическая значимость неясна
Комбинация секреторной гиперстимуляции с введением желчных кислот в панкреатический проток	<ul style="list-style-type: none"> • Комбинированное действие церулеина и гликодезоксихолевой кислоты вызывает острый панкреатит надежнее, чем индукция одного препарата • Относительно легко выполнять, воспроизводимый, недорогой • Уровень смертности животных колеблется от 6% до 42% в течение 24 часов 	<ul style="list-style-type: none"> • Высокие концентрации желчных кислот слишком быстро приводят к обширному некрозу • Применение низких концентраций вызывает острый панкреатит без летальных исходов 	<ul style="list-style-type: none"> • Развивается панкреатит средней степени тяжести с однородным повреждением поджелудочной железы

Учитывая некоторые методологические ограничения существующих моделей острого панкреатита для применения терапии, было предпринято много попыток модифицировать имеющиеся модели, что бы они были сходны с

человеческой. Однако ни одна из существующих экспериментальных моделей в настоящее время не является полностью удовлетворительной. Поэтому сравнение существующих моделей является сложным, а интерпретация результатов как следствие затруднена. Дальнейшее стандартизация этих моделей может позволить нам выбрать наиболее подходящую модель для изучения и оценки новых методов лечения.

Таким образом наиболее физиологичными моделями панкреонекроза на данный момент считаются модели с введением желчных кислот и их продуктов в панкреатический проток. Но данная процедура затруднена за счет обязательного вскрытия просвета двенадцатиперстной кишки для поиска и канюлирования большого дуоденального сосочка, что в свою очередь может вызывать собственные изменения биохимических показателей крови, а также осложнения в виде несостоятельности кишечных швов, механической кишечной непроходимости (в связи крайне малым просветом кишечника экспериментального животного). Поэтому одной из задач нашего исследования явилось создание легко воспроизводимой модели панкреонекроза с наименее агрессивной техникой выполнения операции.

1.4 Терапевтическая гипотермия (общая) и искусственная локальная гипотермия поджелудочной железы

Исторические описания использования гипотермии как метода лечения накопилось очень много, причем в терапевтических целях применялась как общая – терапевтическая (охлаждение всего организма), так и местная (локальная) гипотермия. В папирусе Эдвина Смита, древнейшем медицинском тексте, относящийся к древнему Египту, упоминается о местном использовании холода для лечения [53]. Таниновую кислоту из семян акаций использовали для «охлаждения сосудов» [54]. Гиппократ применял холодную воду для лечения отеков и болей в суставах [55]. Гален предложил холодное зелье для лечения лихорадки, и также придумал «холодный крем» для охлаждения кожи после солнечных ожогов [56]. Вскоре после изобретения ртутного термометра, Джеймс Керри задокументировал первые записи о температуре тела и о его влиянии на здоровье человека. Во время француско-русской войны в 1812 году Ларри пытался сохранить поврежденные конечности с помощью гипотермии и использовать свойства холода для уменьшения болей в ампутированных конечностях [57]. Первые лабораторные исследования показали, что во время гипотермии развивается «холодный наркоз», который равносильный обратимой гибернации. 1960-х годах обнаружили взаимосвязь между гипотермией и снижением потребления кислорода мозга [58]. Это привело к широкому использованию гипотермии не только для сердечно-сосудистой хирургии, но и для головного и спинного мозга. Однако количество осложнений, наблюдаемых во время осуществления охлаждения и согревания, вынудили многих клиницистов отказаться от этой методики лечения. Между 1960 и 1990 годами упоминается лишь несколько публикаций, где использовали терапевтическую гипотермию. Интерес к терапевтической гипотермии вновь возобновился в

1990-х годах, когда начали делать эксперименты на животных чтобы, прояснить разницу между терапевтической гипотермией и глубокой [59].

В клинической практике терапевтическая гипотермия используется для борьбы с системными реакциями после ишемии, клеточными повреждениями, изучается как механизм торможения таких процессов как кардиогенный шок, повреждения легких, кишечника, реперфузионные повреждения легких, печени и эндотелия. В многочисленных исследованиях показано иммуномодулирующее действие гипотермии, в том числе уменьшение провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-6), стимуляция противовоспалительных цитокинов (IL-10), снижение системного окислительного стресса и ингибирование нейтрофилов, моноцитов и макрофагов. Наиболее заметное исследование проведено на церулеиновой модели острого панкреатита на крысах, где было показано, что терапевтическая гипотермия снижает сывороточный IL-1, IL-6, TNF- α , увеличивает сывороточный IL-10, уменьшает сывороточную амилазу и липазу, снижает гистологическую степень повреждения поджелудочной железы по сравнению с нормотермической, и значительно увеличивает выживаемость. Но в клинической практике для лечения ОП терапевтическая гипотермия, как правило, не используется.

Искусственная локальная гипотермия (ИЛГ) – это один из неспецифических методов торможения внутриорганной активации панкреатических ферментов, позволяющий уменьшить их патологическое влияние на организм больного и деструкцию поджелудочной железы. Несмотря на допустимое использование общей гипотермии, в панкреатологии предпочтение отдается локальной гипотермии. Так в клиническом протоколе диагностики и лечения острого панкреатита МЗ РК от 2018 года в разделе других методов лечения указана местная (локальная) гипотермия [60].

Первые данные о применении искусственной локальной гипотермии, как метод лечения острого панкреатита, датируются 1966 годом [61]. Но до этого, в 1961 году, O.Wangenstein и соавт., при изучении влияния местной гипотермии для остановки профузного желудочного кровотечения, замечено, что гипотермия желудка угнетает синтез пепсина и хлористоводородной кислоты на 75%. Именно эти данные явились основанием для использования гипотермии желудка для лечения больных с острым панкреатитом. В Советском Союзе эти исследования проводились под началом В.В. Виноградова, совместно с Р.А. Маркосян и В.П. Бурлаченко, они пришли к выводу, что локальная транжелудочная гипотермия положительно влияет на течение острого панкреатита, обусловленное следующими факторами: снижением ферментативной функции поджелудочной железы; антигипоксическим эффектом; анальгетическим эффектом; временным фактором. Далее о положительном эффекте охлаждения поджелудочной железы отмечены в докладах ученых, таких как И.З. Козлов в 1969 г., [62], И.В. Бабрис 1972 г., [63], А.Г. Караванов в 1976 г., В.Г. Василькив в 1977 г. [64].

А.А. Шалимовым и соавт. установлено, что снижение температуры поджелудочной железы в пределах $+35$ до $+10^{\circ}\text{C}$, не влияет на функцию островков Лангерганса, при этом угнетает функцию экзокринного аппарата. При снижении температуры от $+5$ до -15°C , развивается отек, воспаление, с последующей деструкцией экзокринного аппарата. При замораживании железы до от -20 до -100°C развивается геморрагический некроз. На основании этих данных авторы пришли к выводу, что охлаждение железы в пределах $+27$ до $+31^{\circ}\text{C}$, является оптимальным температурным диапазоном для подавления функции экзокринного аппарата при сохранении эндокринной функции [65].

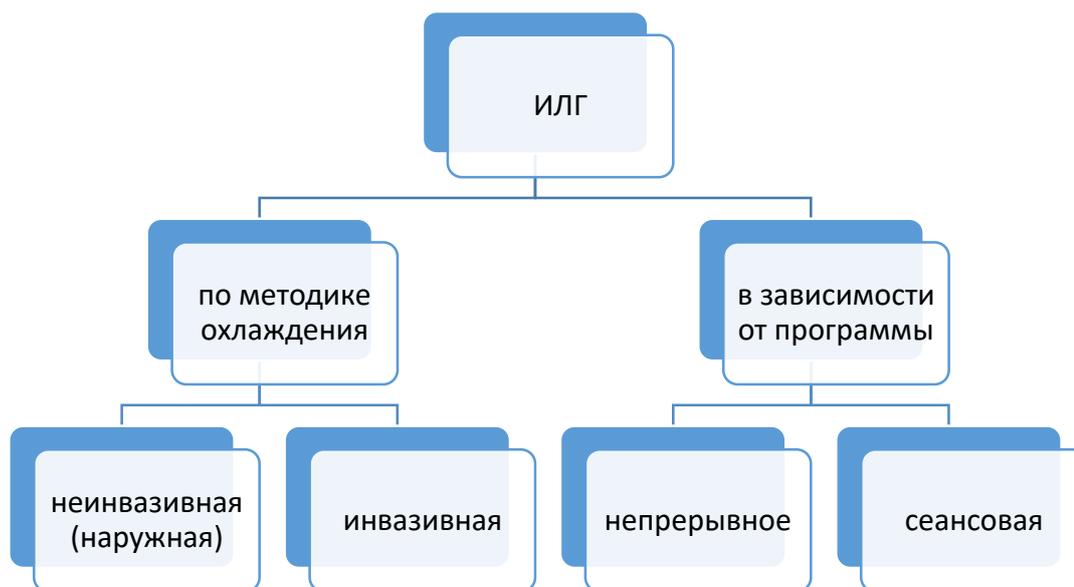


Рисунок 1– Классификация ИЛГ

По методике охлаждения различают неинвазивную наружную ИЛГ и инвазивную ИЛГ. Широкое распространение пользуется методика наружной гипотермии живота с использованием пузырей со льдом. Инвазивная ИЛГ включает в себя такие методы как внутрижелудочная, сальниковая и внутрисосудистая гипотермия. Непрерывная ИЛГ заключается в проведении гипотермии до уменьшения выраженности отечно-деструктивного процесса в ПЖ, сеансовая ИЛГ в проведении сеансов гипотермии, суммарное действие которой зависит от частоты и кратности повторения.

Желудочная гипотермия различается по способу охлаждения: открытая и закрытая. При открытом способе применяют двухпросветный зонд, по одной из которых, хладагент попадает в желудок, а по другой удаляется из него. Обычно используется ледяная вода. Длительность сеанса 5-6 часов, кратность 2-3 суток. Несмотря на простоту выполнения, данный метод обладает рядом побочных действий: опасность регургитации при переполнении, нарушение водно-электролитного баланса вследствие длительности процедуры, повреждение слизистой оболочки желудка и образование эрозий.

При закрытом способе на конце двухпросветного зонда прикрепляется баллон, в котором циркулирует хладагент, обычно 50% этиловый спирт.

Температура хладоносителя -1°C . Таким образом, баллон не соприкасается со слизистой оболочкой желудка. К недостатку данного метода можно отнести возможность внутрижелудочкового разрыва баллона и отравление хладагентом, травмирование и ишемия слизистой оболочки желудка вследствие длительного сдавливания латексным баллоном. По этой причине данные методики не получили широкого применения [66].

Большую роль в изучении гипотермии при панкреатите внесли А.А. Шалимов и соавторы. Они использовали метод аппаратной гипотермии. В монографии «Клиническая хирургия, 1982, 11, с. 1-7» отмечено: «Аппарат «Криоэлектроника-2», снабженный криоапликатором, плотно прижимают к охлаждаемой поверхности органа. В течение 3-8 мин температуру в зоне воздействия холода снижают до 0°C - 4°C и в этом режиме охлаждение продолжают до 10-20 мин, при этом ткань железы охлаждается до 24°C . После прекращения воздействия холода температура в области железы самостоятельно повышается, однако она остается на $0,5^{\circ}\text{C}$ - $1,5^{\circ}\text{C}$ ниже исходной величины. Манипуляция сопровождается заметным уменьшением отека железы. Криовоздействие на железу осуществляют также при помощи баллона из латекса, который трубками соединяют с резервуаром, из которого поступает 30° этанол. Сам же баллон вводят или в полость желудка, или в сальниковую сумку. Длительность охлаждения составляет 2-4 ч через каждые 6-8 ч в течение 1-2 суток. Главным недостатком выше описанного метода, по мнению В.И. Шапошникова, является «необходимость широкого вскрытия сальниковой сумки с полным обнажением железы, так и невозможность равномерного и объемного охлаждения всех отделов органа, из-за неровности его поверхности и наличия плотноэластической инфильтрации ткани, что наблюдается при деструктивных формах острого панкреатита».

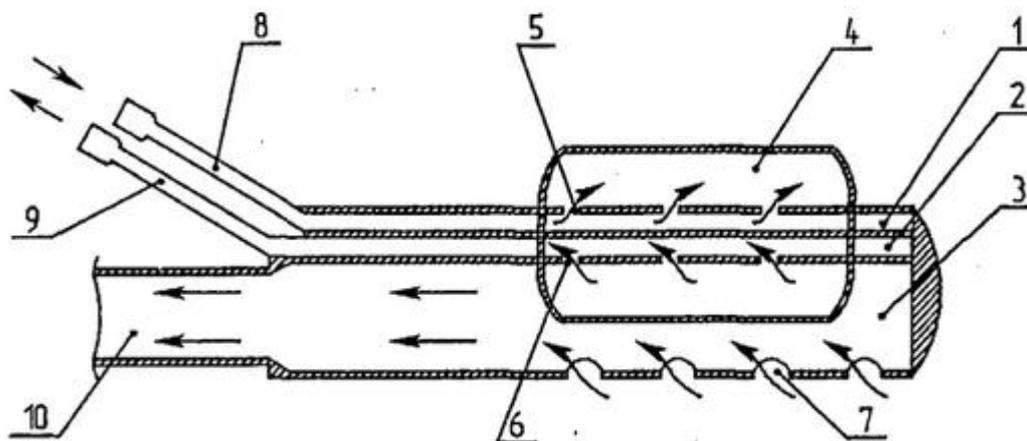
Используя в качестве прототипа модель А.А. Шалимова, В.И. Шапошников предложил собственный метод аппаратной гипотермии, суть которого заключается в орошении передней и боковых поверхностей железы хлорэтилом, со свободным испарением его в атмосферу, после чего на поверхности железы образуется слой из кристалликов льда, который позволяет добиться снижения температуры железы до 0°C - 4°C , при котором угнетается, так и идет деструкция экзокринного аппарата с сохранением функции островковой ткани (Патент РФ, № 2110219, дата публикации 10.05.1998г.).

Шапошниковым В.И. и соавт. был проведен эксперимент на собаках, где охлаждали поджелудочную железу тающим льдом или орошением хлорэтила до $+19^{\circ}\text{C}$ - $+22^{\circ}\text{C}$. Описанную методику ИЛГ применяли у 8 пациентов, с целью профилактики острого деструктивного послеоперационного панкреатита. Наблюдения за этими больными показало отсутствие у этих пациентов послеоперационного деструктивного панкреатита [67].

В диссертационной работе Морозовой А.Б. показано, что применение локальной гипотермии поджелудочной железы и воротной вены в комплексном лечении больных с острым деструктивным панкреатитом позволяет снизить количество осложнений и летальных исходов. В её работе описана собственная

методика гипотермии поджелудочной железы и воротной вены, где во время лапароскопии устанавливалось устройство для локальной гипотермии поджелудочной железы, при невозможности под печечно-двенадцатиперстную связку.

Устройство для проведения прямой локальной гипотермии поджелудочной железы



1. Канал подачи холодной жидкости
2. Канал отвода отработанной жидкости из баллона
3. Канал эвакуации содержимого из брюшной полости
4. Эластичный баллон с охлаждающей жидкостью
5. Отверстия для подачи холодной жидкости
6. Отверстия для отвода отработанной жидкости
7. Отверстия для забора экссудата из брюшной полости
8. Переходник для подачи холодной жидкости
9. Переходник для отвода отработанной жидкости
10. Канал отвода экссудата из брюшной полости

Рисунок 2 – Устройство для проведения локальной гипотермии предложенное Морозовой А.Б [68]

Устройство представляет из себя трубчатый корпус из силиконовой резины. Имеет 3 канала: канал для подачи холодной жидкости (1), канал для отвода отработанной жидкости из баллона (2), канал для эвакуации содержимого из брюшной полости (3). Баллон располагается на одной стороне зонда, для лучшего прилегания к поджелудочной железе и гепатодуоденальной связке (4). Гипотермию поджелудочной железы производили в течение 24 часов, на протяжении 5-7 суток охлажденным физиологическим раствором до $+5+7^{\circ}\text{C}$ со скоростью 50 мл в минуту. Температура отработанной жидкости снаружи составляла $+18-+20^{\circ}\text{C}$, температура жидкости в баллоне соответствовала $+12-+15^{\circ}\text{C}$, которая является безопасной для панкреатических островков Лангерганса. Результаты лечения сравнивались с группой контроля без проведения локальной гипотермии поджелудочной железы. Оценивалась динамика клинических и биохимических показателей крови в первые, третьи и пятые сутки от начала лечения. Был сделан вывод, что применение локальной

гипотермии поджелудочной железы и портальной системы приводило уменьшению осложнений и летальности у больных с панкреонекрозом [68].

Известны различные методики интраоперационной локальной гипотермии поджелудочной железы. Одним из них является «Способ гипотермии поджелудочной железы (патент РФ №2110219 от 10 мая 1998г), который заключается в проведении лапаротомии, вскрытии сальниковой сумки, субоперационным и послеоперационным орошением поджелудочной железы раствором хлорэтила в течение 18-20 минут.

Известен метод с использованием устройства для эндовидеохирургической визуализации, динамического наблюдения и проведения лечебной гипотермии поджелудочной железы. Он был предложен Шугаевым А.И., Гера И.Н. [69]. Основной целью данного изобретения являлось – снижение травматизации операции, максимальное визуализация поджелудочной железы и прилежащих тканей, возможность динамического наблюдения и проведение лечебных манипуляций в этой зоне. Гипотермию производили путем перфузии охлажденного физиологического раствора.

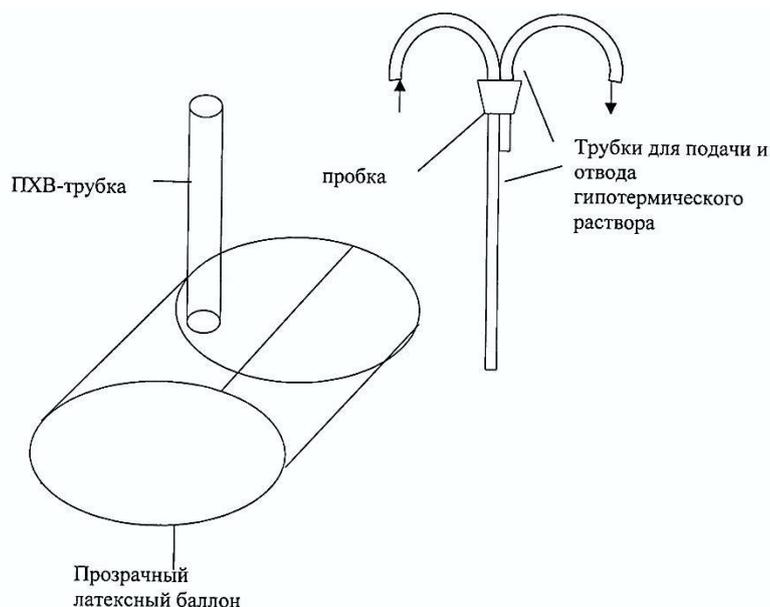


Рисунок 3 – Устройство для эндовидеохирургической визуализации, динамического наблюдения и проведения лечебной гипотермии поджелудочной железы [69]

Устройство, содержащее латексный баллон, отличается тем, что стенки латексного баллона являются прозрачными, так же она содержит впаянную трубку из поливинилхлорида, внутренний диаметр которой соответствует наружному диаметру троакара, через которую инсуффлируют углекислый газ. Устройство снабжено проточной системой, которую устанавливают в баллон после извлечения троакара. Устройство проводится в сальниковую сумку путем проделывания небольшого разреза в желудочно-ободочной связке. Затем

баллон раздувается и производится осмотр с помощью лапороскопа. В послеоперационном периоде проводится перфузия гипотермическим раствором, также через отдельные дренажи в сальниковую сумку вводятся растворы ингибиторов протеолитических ферментов, антисептиков.

На современном этапе развития биомедицины и биотехнологии для решения проблемы острого панкреатита предложен инновационный метод от мультидисциплинарной команды механиков и биоинженеров университета Temple (Филадельфия). Они сконструировали назопанкреатический стент, который позволяет с помощью эндоскопии локально охлаждать ткань поджелудочной железы. В результате внутрипротокового охлаждения уменьшается повреждение клеток и замедляется воспалительный процесс, благодаря чему достигается терапевтический эффект. Изобретение высоко оценено Национальным Институтом Биомедицины и Биотехнологии США.

Большое количество данных, полученных в ходе экспериментов на животных, свидетельствует о том, что гипотермия может быть эффективной в различных клинических ситуациях. Эти наблюдения были подтверждены растущим числом клинических исследований, показывающих, что гипотермия может быть использована в таких ситуациях, как постгипоксическая травма, после сердечно-легочной реанимации. Но как отмечалось ранее для лечения острого панкреатита применима гипотермия в виде местного воздействия холода на область поджелудочной железы.

Представленные неинвазивные и инвазивные методы искусственной локальной гипотермии имеют ряд недостатков. Неинвазивные кроме озвученных выше своим недостатком имеет не прямое соприкосновение с тканями поджелудочной железы, что осложняет контроль непосредственного охлаждения нужного органа. Инвазивные методы, такие как аппаратная гипотермия подразумевает постоянное нахождение в брюшной полости трубок. Последний момент может быть воротами для инфекции, а также вызывать воспалительный процесс в месте стояния трубок, что может влиять на «чистоту» биохимических показателей крови. В связи с чем задачей нашего исследования стало создание собственного метода интраоперационного охлаждения поджелудочной железы.

Терапевтическая гипотермия – это управляемый метод лечения, направленное на снижение температуры тела [70]. Установлено, что охлаждение поджелудочной железы до $+10^{\circ}\text{C}$, угнетает функцию экзокринного аппарата, при этом не влияет на структуру и функцию островков Лангерганса [71].

Медицинские эксперименты с использованием криотехники в различных её видах имеют достаточную популярность среди исследователей. Регулярно публикуются работы, так или иначе связанные с использованием холода как физического фактора воздействия на биологические объекты. Удобность методов генерализованного охлаждения биологических тканей до температуры в 20-25 градусов по Цельсию состоит в том, что при таком состоянии значительно замедляется скорость проведения процессов ферментативного

катализа [72]. Точная интерпретация показателей темпов охлаждения биологических тканей с одной стороны, а также темпов нагревания физических хладагентов даёт возможность удобного маневрирования в скоростях протекания биохимических реакций, а, следовательно, и в тех случаях, когда замедление процессов в органе является основным звеном патогенетического лечения.

1.5. Внеклеточные нуклеиновые кислоты – их патогенетическая и диагностическая роль при различных заболеваниях.

В настоящее время возрастает интерес к определению внеклеточных нуклеиновых кислот в крови и биологических жидкостях организма, что связано с их прогностической и диагностической значимостью при формировании ряда патологических состояний. Впервые они были обнаружены в крови, затем в ликворе, лимфе, моче и т.д. В последние годы эти молекулярные паттерны рассматриваются как потенциальные диагностические, прогностические и предиктивные маркеры ряда заболеваний. Появление в крови их низкомолекулярных фрагментов зачастую возникает при развитии рака, инсульта, при ишемических процессах, асептическом и системном воспалении и др [73; 74].

Если еще недавно происхождение внеклеточных или циркулирующих нуклеиновых кислот (вкНК) связывали с клеточным распадом, то в последнее время приходит понимание того, что некоторая часть циркулирующих нуклеиновых кислот участвует в особом виде гуморальной регуляции (в горизонтальном переносе генетической информации). В норме, в свободном состоянии или в составе специализированных органелл (экзосом) они играют важную роль в межклеточной кооперации, в организме онкологического больного – во взаимодействии и взаимовлиянии опухолевых и нормальных клеток [75; 76].

Внеклеточные ДНК – олигомеры могут связываться с белками, в частности с альбумином, фибронектином, лактоферрином и др. Приблизительно 1.5% белков плазмы крови обладают способностью связывать вкНК. Химическая модификация вкДНК оказывает безусловное влияние на их свойства. С клетками крови (эритроцитами и лейкоцитами) вкНК могут связываться как с помощью ионных взаимодействий, так и с белками клеточной мембраны [77].

Определенный вклад в общий пул вкНК могут вносить и нейтрофильные внеклеточные ловушки, при образовании которых во внеклеточное пространство секретруется ДНК в комплексе с гистонами и ферментами, высвобождаемыми из гранул нейтрофилов.

В последние годы представляется перспективным исследование эпигенетических модификаций циркулирующей ДНК. Речь идет о программном разделении метилированной вкДНК по фракциям, которые соответствуют специализированным клеткам организма человека, что дает возможность определять патологически измененные клетки органа, которые избыточно синтезируют и секретируют специфичную вкДНК [78].

Бондарь Г.В. и соавт. (2013) высказали мнение, что внеклеточные нуклеиновые кислоты могут оказывать как стимулирующее, так и ингибирующее воздействие на иммунную систему. Эффект определяется нуклеотидной последовательностью вкНК, метилированием, а также зависит от того, находится ли вкНК в составе белкового комплекса [79].

Одним из приоритетных направлений в медико-биологических исследованиях является изучение внеклеточных нуклеиновых кислот (вкНК) как молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением (damage-associated molecular patterns, DAMPs) [80]. В условиях окислительного стресса происходит окислительное повреждение ДН и фрагменты окисленной ДНК высвобождаясь из ядер клеток выполняют функцию стресс-сигнала. Окисленная ДНК способна стимулировать образование АФК, которые запускают адаптивный ответ, включающий изменение экспрессии генов ферментов антиоксидантной защиты и детоксикации, образование нитей стрессорного актина и т.д. Эта гипотеза основана на данных исследований на культуре клеток и требует дальнейшей экспериментальной проверки [81].

Помимо внеклеточных ДНК, исследуются и РНК, главным образом microRNA, которые вовлечены в разнообразные процессы, включая иммунный ответ, репарацию ДНК, апоптоз, реакции окислительного стресса. Основная функция циркулирующих microRNA – обеспечение внеклеточной коммуникации, дифференциации и пролиферации клеток. Есть предположение об активном механизме высвобождения внеклеточных microRNA, в частности посредством церамид-зависимого секреторного механизма. В плазме крови miRNA циркулирует в комплексе с липопротеинами, апоптотическими тельцами, микровезикулами или экзосомами, что делает их достаточно стабильными [82]. Циркулирующие микровезикулы microRNA рассматриваются как источник потенциальных биомаркеров для прогноза прогрессирования опухолей, ангиогенеза, тромбоза и ответа на таргетную терапию [83].

Достигнут определенный прогресс в понимании механизма высвобождения вкРНК. Показано, что вкРНК могут высвобождаться из клеток как путем везикулярного транспорта, так и в комплексе с белками, защищающими их от воздействия эндонуклеаз. По существующей гипотезе именно подобного рода защищенные везикулами или белками РНК выполняют функцию межклеточных коммуникаторов [84].

Одним из наиболее изученных, на данный момент является вопрос о роли вкНК в развитии и коррекции онкологических заболеваний. Концентрации вкДНК в крови больных со злокачественными новообразованиями с различной локализацией опухоли (колоректальный рак, рак легких, молочной железы, желудка и пищевода и др.) значительно выше, по сравнению со здоровыми лицами. Причинами увеличения вкНК в крови являются апоптоз и/или некроз клеток опухоли [85; 86].

Уровень циркулирующей ДНК в крови возрастает при развитии аутоиммунной патологии [87], причем концентрация ДНК в плазме больных

системной красной волчанкой, находящихся в состоянии ремиссии, не отличается от нормы, а значительное повышение концентрации циркулирующей ДНК отмечено только у пациентов с активной формой заболевания [88].

Исследование уровня внНК в крови больных тубулопатиями и гломерулопатиями показало, что вкРНК снижались в плазме крови больных всех обследованных групп, но возрос уровень вкРНК, сорбированных на эритроцитах [89]. Анализ изменения вкДНК в эритроцитах и плазме крови больных выявил достоверные отличия, по сравнению с контролем у больных с хроническим гломерулонефритом.

Обсуждается роль вкНК в асептическом воспалении [90; 91]. Персистенция в крови внеклеточных нуклеиновых кислот вследствие неэффективного клиренса может вызвать каскад реакций, характерных для системного воспаления [92].

Отмечена диагностическая значимость концентрации циркулирующей в крови ДНК при оценке тяжести травмы. Обнаруженная достоверная корреляция уровня внеклеточной ДНК с тяжестью травмы позволяет прогнозировать возможность травматического шока и оценить степень тяжести травмы [93].

Интересным для изучения остается вопрос изменения концентраций вкНК при различных патологиях под влиянием холодового воздействия. В работе Ginneken I. (2022) установлено, что вкДНК и вкРНК потенциально могут использоваться в качестве биомаркеров состояния миокарда, а также предоставлять информацию о роли конкретных типов клеток или процессов во время гипотермической машинной перфузии сердечного трансплантата [94]. Aslami H. et al. (2018) в своем исследовании показали, что остановка сердца приводит к увеличению уровня циркулирующей митохондриальной ДНК в плазме крови, который снижаются во время применения протокола управляемой гипотермии у пациентов с целевой температурой 33 °С [95].

Тем не менее, несмотря на вовлеченность этих молекулярных паттернов в патогенез многих заболеваний, на сегодня нет данных о роли внеклеточной ДНК, РНК при оценке деструктивно-воспалительных процессов в частности в поджелудочной железе. В связи с этим, представляется важным изучение роли внеклеточных нуклеиновых кислот (ДНК, РНК) при прогрессировании патологического процесса в поджелудочной железе и их возможной корреляции со степенью выраженности деструктивного процесса. Актуальны также, при панкреонекрозе прогностические перспективы определения показателей вкНК. Данные исследование могут обеспечить определенный прогресс в изучении патогенеза и дать этиопатогенетическое объяснение актуальным способам коррекции деструктивно-воспалительных процессов в поджелудочной железе.

1.6 Метаболиты пуринового обмена – их патогенетическая и диагностическая роль при заболеваниях поджелудочной железы.

Диагноз острого панкреатита требует наличия как минимум двух из трех следующих критериев: 1. боль в животе, соответствующая заболеванию, 2.

биохимические признаки панкреатита (уровень амилазы и / или липазы в сыворотке более чем в три раза превышает верхний предел нормы) и 3. характерные результаты визуализации брюшной полости [96].

Согласно «Рекомендации WSES 2019» по ведению тяжелого острого панкреатита» [97], а также согласно Клинического протокола МЗ РК «Острый панкреатит» от 2018 года [98] необходимо провести следующие диагностические лабораторные показатели:

Определить уровень амилазы и липазы. При панкреатите пороговое значение сывороточной амилазы и липазы обычно определяется как трехкратное превышение верхнего предела.

Однако новые исследования говорят о том, что измерение амилазы не всегда является необходимым для диагностики. Среди пациентов, которым была назначена амилаза, эти пациенты обычно направлялись на хирургические процедуры, возможно, потому, что нормализация амилазы может быть документирована быстрее, чем нормализация липазы [99].

Уровень С-реактивного белка ≥ 150 мг / л на третьи сутки может быть использован в качестве прогностического фактора для тяжелого острого панкреатита [100].

Гематокрит $> 44\%$ представляет собой независимый фактор риска панкреонекроза. Низкий гематокрит указывает на низкий риск панкреонекроза (PNec) у пациентов с острым панкреатитом [101].

Мочевина > 20 мг / дл выступает в качестве независимого предиктора смертности [102].

Прокальцитонин - самый чувствительный лабораторный тест для выявления инфекции поджелудочной железы, и низкие значения в сыворотке крови, по-видимому, являются сильными отрицательными предикторами инфицированного некроза.

При отсутствии камней в желчном пузыре или значительном употреблении алкоголя в анамнезе следует измерить уровни триглицеридов и кальция в сыворотке крови. Уровни триглицеридов в сыворотке выше $11,3$ ммоль / л (1000 мг / дл) указывают на это как на этиологию. Органная недостаточность при остром панкреатите может быть с высокой точностью предсказана при поступлении в больницу с использованием комбинации интерлейкина 10 в плазме и измерения содержания кальция в сыворотке [103].

Было проведено множество исследований, основанных на понимании процесса развития острого панкреатита и перехода его в стадию панкреонекроза (PNec).

По данным Lipinski M. (2013), увеличение креатинина в течение первых 48 часов тесно связано с развитием некротического панкреатита [104].

В исследованиях Rainio M. (2019) уровни биомаркеров (трипсиногена 1, трипсиногена 2 и трипсиногена 3, комплекса трипсина 2 и $\alpha 1$ -антитрипсина) и креатинина в плазме коррелировали с тяжестью острого панкреатита и развитием острого панкреатита. У пациентов без острого панкреатита при поступлении SPINK1 (сывороточный ингибитор сериновой пептидазы Kazal-

Туре 1) был независимым маркером более позднего развития тяжелого острого панкреатита [105].

Результаты работы команды Shu W. (2020) показывают, что изначально повышенный уровень лактата в артериальной крови независимо связан с неблагоприятными исходами и смертью пациентов с тяжелым острым панкреатитом и может служить ранним индикатором стратификации высокого риска [106].

Так же снижение холестерина липопротеидов высокой плотности, в исследованиях Zhang Y. (2017) показало себя независимым предиктором стойкой органной недостаточности, некроза поджелудочной железы и смертности при остром панкреатите [107].

Исследование сывороточного гликопротеина 2, как маркера для прогнозирования тяжести острого панкреатита, показало, что уровень GP2 в сыворотке повышается у пациентов с острым панкреатитом. Это положительно коррелирует с тяжестью острого панкреатита предполагая его потенциал для прогнозирования тяжести данного заболевания [108].

Но данные показатели недостаточны, и поэтому до сих пор происходит изучение многочисленных биомаркеров, в качестве потенциальных ранних предикторов тяжести острого панкреатита. В настоящее время практически нет лабораторных тестов для прогнозирования степени тяжести ОП [109].

Выявление пациентов с риском тяжелого заболевания на ранней стадии острого панкреатита является важным шагом к управлению лечением и улучшению результатов.

Одним из потенциальных биомаркеров тяжести течения острого панкреатита могут быть пурины. Пурины - гуанин, гипоксантин, аденин, ксантин и мочевая кислота являются последующими метаболитами АТФ и ГТФ. В ткани, которая находится в состоянии метаболического стресса, например, во время гипоксии или ишемии, внутриклеточный пул АТФ распадается на аденозин и последующие метаболиты. Эти пурины высвобождаются из клеток через транспортеры и, таким образом, являются очень ранним маркером метаболического стресса, который возникает до гибели клетки [110; 111].

Уровень пуринов изучают при поиске диагностических и прогностических биохимических параметров в диагностике многих заболеваний и патологических состояний: неонатальной гипоксически-ишемической энцефалопатии [112], в ишемизированных тканях афалин во время дайвинга [113], в исследованиях влияния противовирусных препаратов на селезенку при пневмониях [114].

Пурины на основе гуанина играют ключевую роль в метаболизме клеток и в нескольких моделях нейродегенеративных расстройств, таких как болезни Паркинсона и Альцгеймера [115]. В исследованиях Muravlyova I. (2020) установлено преимущественное накопление внеклеточной концентрации аденина, гипоксантина и мочевой кислоты у больных с острым инфарктом миокарда [116]. Исследование пуриновых метаболитов крови при

онкопатологии на примере группы больных местно-распространенным раком молочной железы показало повышение всех видов интермедиатов пуринового обмена в плазме крови, кроме мочевой кислоты [117]. Содержание пуриновых оснований и метаболитов пуринового обмена в плазме крови при хронической болезни почек изменяется в зависимости от стадии заболевания и выраженности хронической почечной недостаточности [118]. Целевые метаболомические исследования показывают, что уровни гуанозинмонофосфата в плазме значительно выше у пациентов с диабетом и ОП [119]. В исследовании Riabov G. A. и соавторов (1993) на примере 26 больных в критическом состоянии с геморрагическим панкреонекрозом и распространенным гнойным перитонитом установлено, что повышенный уровень гипоксантина и ксантина в плазме крови может служить дополнительным критерием тканевой гипоксии у хирургических больных в критическом состоянии [120].

Метаболиты пуриновой нуклеозидфосфорилазы (NP) в сыворотке крови могут определять аденокарциному поджелудочной железы [121].

Малоизученным остается вопрос метаболизма пуринов при различных заболеваниях под влиянием низких температур. Так Н. Imura (2002) с командой показали в эксперименте, что снижение скорости катаболизма пуринов при гипотермии, вероятно, связано со снижением метаболической активности во время ишемии миокарда [122]. Также в своем исследовании пуринового катаболизма в изолированном миокарде, охлажденном до 0,5 °С (трансплантат сердца) у собак, приматов и человека Т. Möllhoff (1991) указал на замедление процессов катаболизма аденина под влиянием низких температур [123]. Результаты эксперимента Т. Cherin (2006) с охлаждением мозга кроликов до температуры 33–34°С показали, что активность гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы головного мозга не зависит от гипоксии-ишемии даже после 4 часов реперфузии и независимо от температуры мозга, что может свидетельствовать о важности этого фермента в сохранении пуринов в головном мозге после неврологического повреждения [124].

В то же время метаболиты пуринового обмена не исследовались при панкреонекрозе и при различных схемах коррекции деструктивных заболеваний поджелудочной железы.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Общая характеристика исследования

В эксперименте были использованы беспородные кролики. Выбор вида экспериментального животного был обусловлен особенностями их жизнедеятельности, так как уход и питание данного вида не представляет сложностей, а также это наименьший вид с анатомически сформированной поджелудочной железой, как органа. Так более мелкие виды экспериментальных животных, такие как мыши и крысы имеют группы клеток поджелудочной железы диффузно расположенных по брыжейке тонкого кишечника [125; 126]. Животные содержались в клетках при температуре 19-23°C, при 12 часовом световом времени и 12 часах темноты в сутки. Все процедуры выполнялись в соответствии с биологическими ритмами животных. Стандартизация и репрезентативность результатов достигалась за счет выбора животных сопоставимых по полу, возрасту и весу. Исследования на животных проводились в соответствии с принципами Международных правил биоэтики Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2013). Дизайн исследования одобрен решением Комитета по биоэтике НАО МУК (протокол № 20 от 17.06.2019, присвоенный номер № 58) (Приложение А). исследование проводилось на базе вивария НАО МУК.

Экспериментальные животные были разделены на 4 группы. Первая группа включала в себя интактных животных, которые были необходимы для промежуточного контроля, калибровки аппаратуры. Во второй группе - моделировался панкреонекроз. Третья группа включала животных с моделированием панкреонекроза и наложением искусственной локальной гипотермии. Четвертая группа (Sham-операция) состояла из кроликов, которым проводилось вскрытие брюшной полости и ее ушивание.

Исследование проведено на 63 беспородных кроликах сопоставимого возраста и веса: 5-6 месяцев и в среднем $2,5 \pm 0,36$ кг.

На основном этапе в эксперименте было использовано 63 беспородных кролика, которые были разделены на 4 группы:

- 1 группа – 9 интактных животных;
- 2 группа – 18 кроликов с моделированием панкреонекроза;
- 3 группа – 18 животных с моделированием панкреонекроза и применением локальной гипотермии;
- 4 группа SHAM – 18 кроликов (лапаротомия и ушивание брюшной полости без моделирования панкреонекроза).

В зависимости от времени после введения аутожелчи в паренхиму поджелудочной железы группы разделены на подгруппы (А, В, С). Группа панкреонекроз: 12 часов – 6 кроликов (А), 24 часа – 6 кроликов (В), 48 часов – 6 кроликов (С); группа панкреонекроз с гипотермией: 12 часов – 6 кроликов (А),

24 часа – 6 кроликов (В), 48 часов – 6 кроликов (С); группа sham: 12 часов – 6 кроликов (А), 24 часа – 6 кроликов (В), 48 часов – 6 кроликов (С).

Во всех группах и подгруппах проводился забор крови для биохимического исследования из ушной вены. Также в момент вывода из эксперимента проводился забор поджелудочной железы для гистологического исследования. Полученный органокомплекс фиксировался.

Животные выводились из эксперимента путем обескровливания в состоянии наркоза, что соответствует пункту М3.13.1 Руководства по эвтаназии животных Американской ассоциации ветеринаров “AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition” [127].

Для воспроизведения модели панкреонекроза для премедикации за 20 минут до операции внутримышечно вводился Sol.Xylasini из расчета 4 мг/ кг (0,2 мл/кг – в 1мл содержится 20 мг) массы тела и далее под внутривенным наркозом Sol.Ketamini 5 мг/ кг (0,1 мл/кг – в 1мл содержится 50 мг).

Для выбора наиболее эффективного охлаждающего агента, с целью создания искусственной локальной гипотермии был проведен стендовый эксперимент. В последнем были использованы: инфракрасный термометр Bing Zun BZ-R6; термостат PetraElectric BF-66 (Германия); сухой лед, полученный из жидкой углекислоты на производстве; обычный лед (полученный путем замораживания воды в бытовом холодильнике при температуре -17°C); аккумулятор холода – карбосиметилцеллюлоза - Ice box Outventure (приобретён в сети магазинов «Спортмастер»), соответственно рисунку 4.



а



б



В



Г



Д



Е

Рисунок 4 – Материалы, использованные в стендовом эксперименте: инфракрасный термометр Bing Zun BZ-R6 (а); термостат PetraElectric BF-66 (б); сухой лед с процессом получения (в, г, д) аккумулятор холода – Ice box Outventure (е).

Для наложения локальной гипотермии был выбран аккумулятор холода – карбосиметилцеллюлоза. Содержимое бокса после замораживания в бытовом холодильнике при температуре -17°C в течении 12 часов, помещалось контейнере(презерватив), который интраоперационно после введения аутожелчи погружался в брюшную полость с экспозицией в 20 минут под контролем температуры в месте наложения ИЛГ в динамике.

2.2 Дизайн исследования

Для формирования репрезентативной выборки, количество животных рассчитывалось по формуле:

$E=N-T$, где E – это ошибка степени свободы, N – это общее количество животных, используемых для эксперимента, T – это общее количество групп, определенное дизайном эксперимента. Данная методика расчёта объема выборки применима в случае, когда не представляется возможным предугадать

результаты исследования и необходимо оценивать различия между группами. Таким образом, учитывая пилотный характер настоящего исследования, предложенная методика расчёта расценена, как наиболее подходящая. По результатам вычисления в группу должны включаться не менее 6 животных. Распределение животных по группам представлено на рисунке 5.

Экспериментальные животные были разделены на 4 группы. Первая группа включала в себя интактных животных, которые были необходимы для промежуточного контроля, калибровки аппаратуры. Во второй группе - моделировался панкреонекроз. Третья группа включала животных с моделированием панкреонекроза и наложением искусственной локальной гипотермии. Четвертая группа (Sham-операция) состояла из кроликов, которым проводилось вскрытие брюшной полости и ее ушивание.

Исследование проведено на 63 беспородных кроликах сопоставимого возраста и веса: 5-6 месяцев и в среднем $2,5 \pm 0,36$ кг, которые были разделены на 4 группы:

1 группа – 9 интактных животных;

2 группа – 18 кроликов с моделированием панкреонекроза;

3 группа – 18 животных с моделированием панкреонекроза и применением локальной гипотермии;

4 группа SHAM – 18 кроликов (лапаротомия и ушивание брюшной полости без моделирования панкреонекроза).

В зависимости от времени после введения аутожелчи в паренхиму поджелудочной железы группы разделены на подгруппы (А, В, С). Группа панкреонекроз: 12 часов – 6 кроликов (А), 24 часа – 6 кроликов (В), 48 часов – 6 кроликов (С); группа панкреонекроз с гипотермией: 12 часов – 6 кроликов (А), 24 часа – 6 кроликов (В), 48 часов – 6 кроликов (С); группа sham: 12 часов – 6 кроликов (А), 24 часа – 6 кроликов (В), 48 часов – 6 кроликов (С).

Во всех группах и подгруппах проводился забор крови для биохимического исследования из ушной вены. Также в момент вывода из эксперимента проводился забор поджелудочной железы для гистологического исследования.

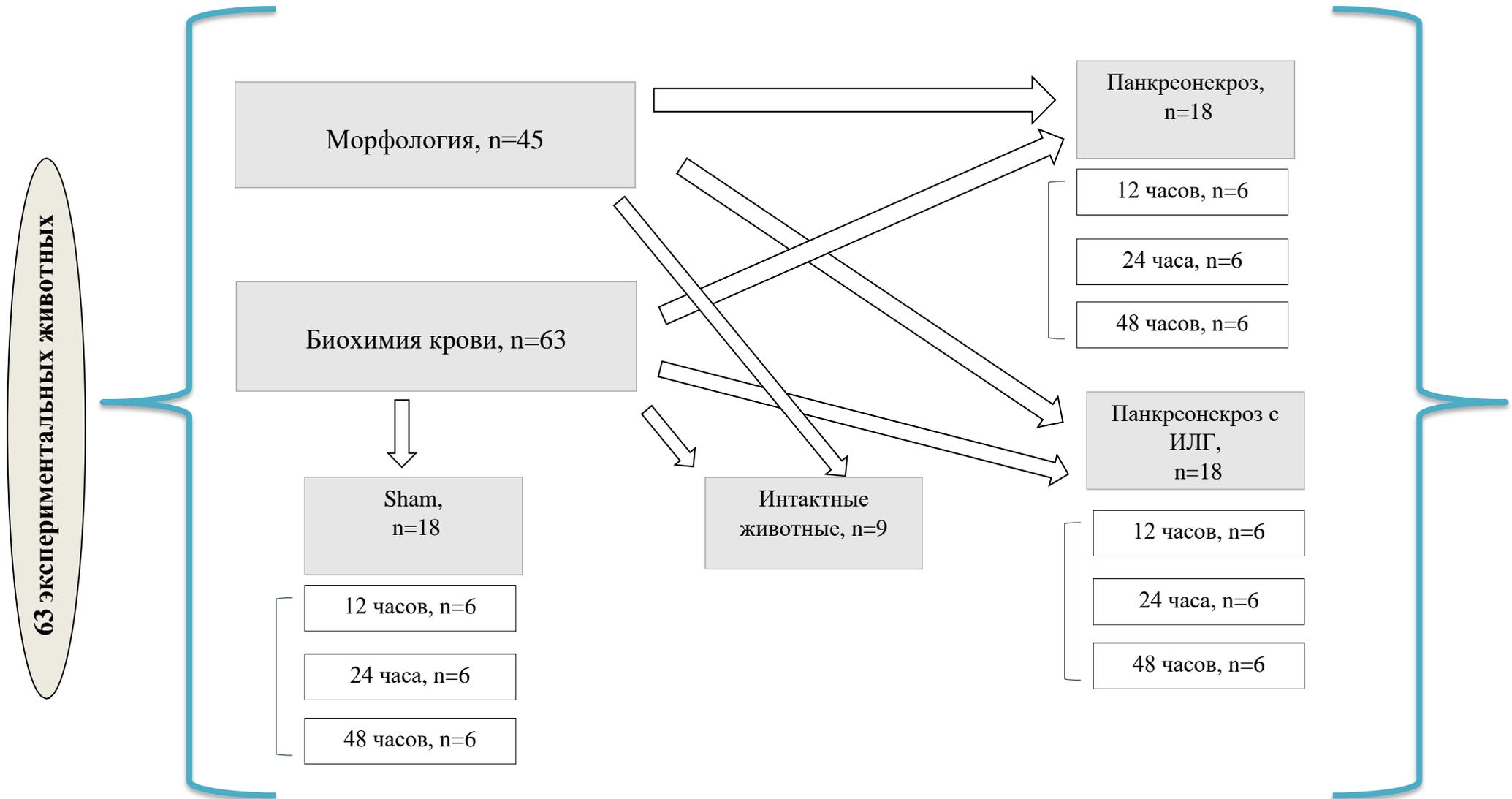


Рисунок 5. Дизайн исследования

2.3 Методы исследования

2.3.1 Биохимические исследования крови

2.3.1.1 Определение концентрации катаболитов пуринового обмена в плазме крови

Катаболиты пуринового обмена в плазме крови определяли путем прямой спектрофотометрии по методике Орешникова Е.В. и соавт., 2008 [128] на базе кафедры биомедицины Медицинского университета Караганды.

В стандартные стеклянные пробирки отдельно вносили по 0,3 мл плазмы крови и отмытых эритроцитов. Затем проводили термокоагуляцию на кипящей водяной бане в течение 5 мин. Обязательным условием являлось активное кипение во избежание дефрагментации коагулянта. После остывания при комнатной температуре в течение нескольких минут в пробирку наливали 3 мл бидистиллированной воды. Через 30 мин инкубации при 37°C измеряли экстинкцию экстракта против чистого экстрагента (бидистиллированная вода) в кювете с длиной оптического хода 10 мм. При этом исходили из того, что экстинкции на волнах 246, 250, 261, 276 и 293 нм. соответственно отражают концентрации в плазме и эритроцитах крови гуанина, гипоксантина, аденина, ксантина и мочевой кислоты. Концентрацию пуриновых оснований выражали в единицах экстинкции (ед.экст.), МК — в мкмоль/л.

$$C = E * 1000$$

где: С – концентрация метаболитов пуринового обмена, ед.экст. (мкмоль/л); 1000 – коэффициент пересчета экстинкции в концентрацию.

Активность фермента ксантинооксидазы оценивали по расчетам индексов ксантин/гипоксантин (1 этап), мочевая кислота/ксантин (2 этап) и мочевая кислота/гипоксантин (оба этапа). Также проводился расчёт отношения ксантина к гуанину, являющегося показателем тяжести гипоксии.

В качестве индикатора интенсивности пуринового обмена (ИПО) рассчитывали величину, представляющую собой отношение концентрации гипоксантина к количеству образующихся из него продуктов: ксантина и мочевой кислоты - и определяющую необратимость катаболизма пуринов.

2.3.1.2 Определение концентрации внеклеточных нуклеиновых кислот в крови

Кислоторастворимую фракцию (КРФ) нуклеотидов, внеклеточную РНК и ДНК выделяют из периферической крови по методу Маркушевой Л.И. с соавторов) [129]. Принцип количественного определения КРФ, РНК и ДНК заключается в экстракции нуклеиновых кислот после гидролиза, проводимого при различной температуре на водяной бане с помощью хлорной кислоты определенной концентрации.

Реактивы: раствор HClO₄ 0,5н, раствор HClO₄ 10%, раствор HClO₄ - 0,14М, раствор HClO₄ 5%, спирт этиловый 96%, HCl конц.

К 1 мл плазмы крови или эритроцитов либо 1-2 млн. лейкоцитов добавляют 5 мл 0,5 н HClO₄, перемешивали, а затем центрифугировали 15 мин при 5000 об/мин (30 мин при 3000 об/мин соответственно). Надосадочную

жидкость сливали в пробирку - это кислоторастворимая фракция (КРФ), в которую входят свободные нуклеотиды, олигонуклеотиды и другие вещества нуклеотидной природы - предшественники нуклеиновых кислот. К осадку приливали 10 мл 10% HClO₄, перемешивали, выдерживали при 37°C 10 мин, а затем центрифугировали 15 мин при 5000 об/мин (30 мин при 3000 об/мин соответственно). Надосадочную жидкость сливали в пробирку - это гидролизат РНК. К осадку приливали 3 мл 10% HClO₄, перемешивали, выдерживали 7 мин при 70°C, а затем центрифугировали 15 мин при 5000 об/мин (30 мин при 3000 об/мин соответственно). Надосадочную жидкость сливали в пробирку - это гидролизат ДНК. Спектрофотометрию КРФ и гидролизатов РНК и ДНК проводили на спектрофотометре в области от 256 до 280 нм. Расчёты велись по формуле:

$$\text{КРФ} = (A \times V) / 100$$

$$A = |1,55 \times E_{280} - 0,76 \times E_{260}|$$

$$V = 141,1858 \times \text{EXP}(-3.7102 \times (E_{280}/E_{260}))$$

$$\text{РНК} = (A \times V) / 100$$

$$A = |1,55 \times E_{280} - 0,76 \times E_{260}|$$

$$V = 141,1858 \times \text{EXP}(-3.7102 \times (E_{280}/E_{260}))$$

$$\text{ДНК} = (A \times V) / 100$$

$$A = |1,55 \times E_{280} - 0,76 \times E_{260}|$$

$$V = 141,1852 \times \text{EXP}(-3.7102 \times (E_{280}/E_{260}))$$

2.3.1.3 Определение концентрации амилазы и липазы в сыворотке крови.

Определение концентрации амилазы и липазы в сыворотке крови экспериментальных животных проводили при помощи общеклинических методов. Единицы измерения У/л.

2.3.2 Морфологические исследования

Для исследования использовался органокомплекс поджелудочной железы с панкреатическим и желчным протоками, после изъятия из брюшной полости измерялись параметры: окружность и продольный размер (рисунок 6а), проводилось макроскопическое описание поджелудочной железы. При помощи шприца измерялось количество выпота в брюшной полости, оценивался характер выпота, результаты заносились в таблицу. Затем органокомплекс фиксировался раствором нейтрального 10% формалина, и далее выполнялась дегидратационная проводка с изопропанолом и пропиткой парафином по общеизвестной методике для гистологического исследования.

Полученные парафиновые блоки нарезали на микротоме Leica SM 2000R, толщиной среза 4-5 микрон, окрашивались гематоксилином и эозином. Световая микроскопия проводилась при помощи компьютеризированного микроскопа Leica DM1000 (рисунок 6б), с получением цветных

микрофотографий для дальнейшего описания и оценки структурных изменений ткани по стандартному алгоритму с характеристикой состояния панкреатических ацинусов, островков Лангерганса, описание сохранности структурных элементов, целостности клеток и ядер, состояние сосудистой системы, наличие воспалительного процесса (лейкоцитарной инфильтрации) и участков кровоизлияний и некроза ткани.



а



б

Рисунок 6 – Этапы морфологического исследования: измерение продольного размера ПЖ (а); Микроскопия с использованием цифрового микроскопа с микрофотографированием Leica DM1000 (б);

Проведено морфометрическое исследование критериев оценки структурных изменений ткани поджелудочной железы. Для проведения сравнительного анализа структурных компонентов ткани поджелудочной железы использовались показатели состояния ядерной субстанции (кариопикноз, кариорексис, кариолизис), оценка распространенности дистрофических изменений и его вида, состояния межучочной волокнистой ткани, наличие очагов липоматоза, некроза и их распространенность, каждый показатель оценивался по балльной системе (таблица 4, 5).

Оценка по балльной системе осуществлена следующим образом:

0 баллов – сохранность гистоструктуры ткани поджелудочной железы, без изменений в ядре и цитоплазме клеток.

1 балл – общая гистоструктура ткани сохранена, но имеются единичные изменения: зернистая дистрофия, пылевидная жировая дистрофия, единичные апоптолические клетки ацинуса, единичные форменные элементы крови, без формирования воспалительного инфильтрата.

2 балла – нарушение гистоструктуры ткани, со структурными изменениями: гидropическая дистрофия, очаговая мелкокапельная жировая дистрофия, фокальные очаги некроза, множественные форменные элементы крови, с формирования очагового воспалительного инфильтрата.

3 балла – выраженные структурные изменения в ацинусах и межучочной ткани поджелудочной железы: дистрофические изменения как вакуольная, баллонная дистрофия, диффузная крупнокапельная жировая дистрофия,

тотальный некроз, распространенные очаги липоматоза, кровоизлияний и диффузная воспалительная инфильтрация.

Для сравнительной оценки гистологических изменений согласно предложенной бальной системы был использован точный критерий Фишера, используемый для определения достоверности различия между независимыми группами по качественным показателям.

2.3.3 Статистическая обработка результатов исследования

Для расчетов и графического оформления результатов использовалось программное обеспечение STATISTICA 12.5 StatSoft, Inc. Для определения различий между количественными данными группами исследования попарно использовался непараметрический критерий Mann–Whitney для независимых групп. Для анализа статистических различий качественных показателей использовали точный критерий Фишера. Данные анализировались при уровне значимости $p=0,05$.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Разработка экспериментальной модели панкреонекроза, индуцированного введением аутожелчи. Морфологическое исследование.

Модель панкреонекроза, индуцированного введением аутожелчи, разработана на 18 беспородных кроликах обоих полов, сопоставимой массы тела.

Этапы операции. После премедикации под внутривенным наркозом производилась средне срединная лапаротомия – послойно рассекалась кожа, подкожно-жировая клетчатка у кроликов практически не выражена, далее апоневроз, брюшина надсекалась и рассекалась по желобоватому зонду - (рисунок 7а). Далее отыскивали желчный пузырь и инсулиновым шприцом набирали желчь (рисунок 7б).

Полученную аутожелчь вводили по 0,1 мл в правую и левую лопасть поджелудочной железы соответственно, введение желчи производили строго в визуально бессосудистой зоне железы, для предотвращения паренхиматозных кровотечений (рисунок 7в) После введения аутожелчи завершали этап индукции панкреонекроза. Далее производили послойное ушивание раны в обратном порядке (рисунок 7г). Послеоперационная обработка раны ветеринарным кожным антисептиком в заключении.

Выведение из эксперимента производили в сроки через 12 (n=6), 24 (n=6) и 48 (n=6) часов после введения аутожелчи. После этого осуществляли забор внутренних органов для морфологического исследования. Поджелудочную железу извлекали целиком, описывали макроскопическую картину, проводили ее измерение и фиксировали в 10% нейтральном формалине. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, исследовали методом световой микроскопии. Полученные результаты сравнивали с результатами контрольной группы интактных животных (n=9).

Морфологические исследования и оценка патологических изменений в ткани поджелудочной железы в определенные сроки.



а



б



В

Г

Рисунок 7 – Ход выполнения операции. Вскрытие брюшной полости, средне-срединная лапаротомия (а); забор аутожелчи инсулиновым шприцом (б); подкапсульное введение аутожелчи (в); ушивание лапаротомной раны (г)

Токсический эффект желчных кислот связан с его повреждающим действием на мембрану панкреоцитов, проникновением дериватов желчи в цитоплазму клеток и интерстиций, а также нарушением высвобождения ферментов поджелудочной железы в проток.

Это совокупность факторов, которые с одной стороны ведут к внутриклеточному отеку и дезинтеграции органелл, с другой к ранней активации трипсина в поджелудочной железе. Как известно, активированный трипсин является активатором каскада ферментов, что в свою очередь запускает механизмы аутолиза панкреоцитов и микроциркуляторные расстройства. Прогрессированию некроза и его геморрагическому характеру способствуют сосудистые расстройства.

В норме поджелудочная железа кролика имеет дольчатое строение, расположена в толще брыжейки тонкой кишки. Имеет бледный розовато-жёлтый цвет, в отличие от жировой ткани, имеющий светло-серый оттенок (рисунок 8) [130].



Рисунок 8 – Нормальная поджелудочная железа кролика

При завершении опыта в сроке 12 часов после введения аутожелчи в обе лопасти поджелудочной железы, макроскопически отмечается полнокровие сосудов капсулы и очаги кровоизлияния в зоне введения аутожелчи, ткань эластической консистенции, размеры органа не претерпевали резких изменений, длина – 4,3 см, ширина – 0,9-1,0 см (рисунок 9а, б, в).



а



б



в

Рисунок 9 – Препарат поджелудочной железы кролика (макроскопическая картина). Срок опыта 12 часов

При завершении эксперимента в сроке 24 часов после введения аутожелчи макроскопически отмечается нарастание отека железы, ее длина составляла 5,8-6,0 см, ширина до 1,5 см, выявляются очаги сливающихся кровоизлияний, полнокровие сосудов капсулы поджелудочной железы в зоне введения аутожелчи, паренхима плотной консистенции (рисунок 10а, б, в).



а



б



в

Рисунок 10. Препарат поджелудочной железы кролика (макроскопическая картина). Срок опыта 24 часа

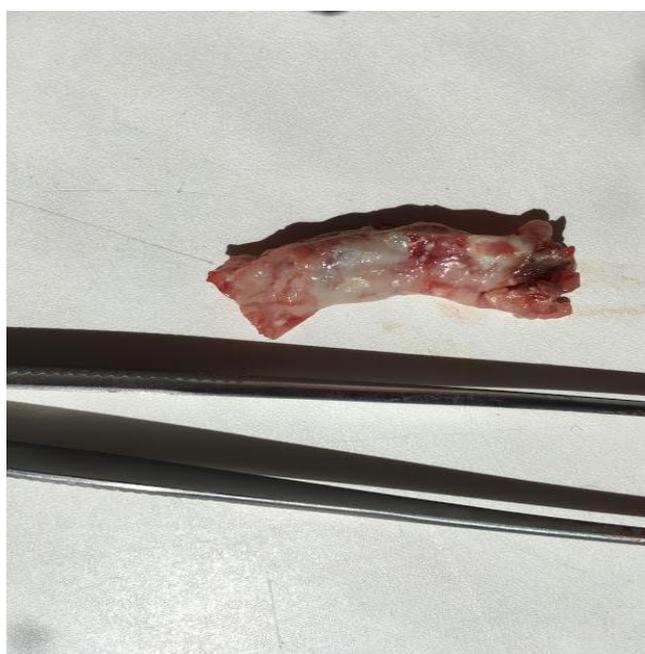
При завершении опыта в сроке 48 часов после введения аутожелчи наблюдается следующие макроскопические изменения: деформация и резкое уменьшение органа в размерах, длина 2,7-3,0 см, ширина до 1,0 и 0,8 см. Под капсулой множественные очаги кровоизлияний, выраженное полнокровие сосудов в зоне введения аутожелчи, консистенция – резко уплотнена (рисунок 11а, б, в).



а



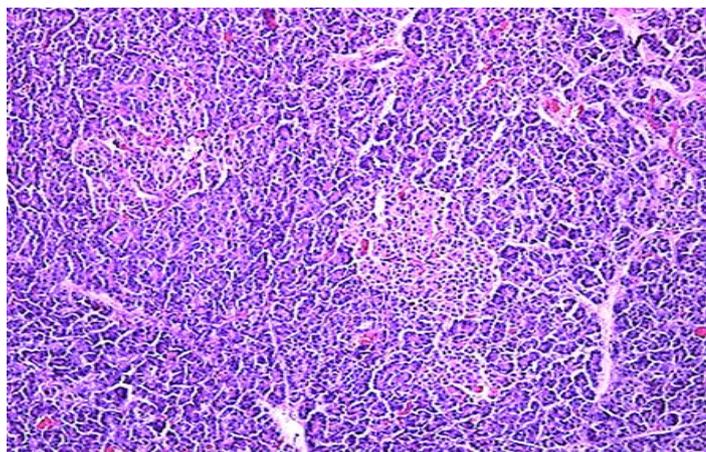
б



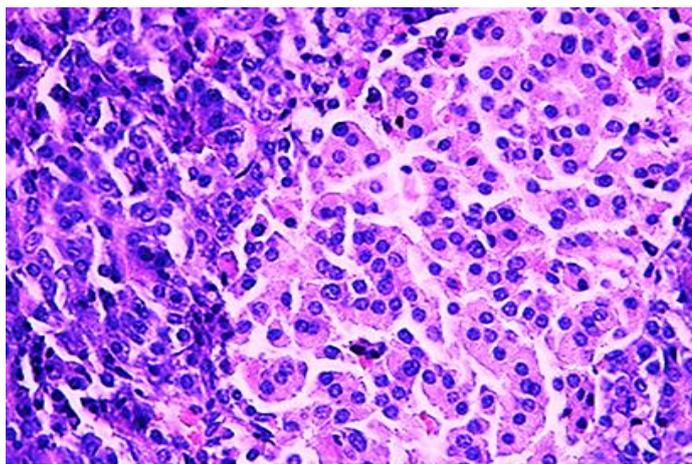
в

Рисунок 11 – Препарат поджелудочной железы кролика (макроскопическая картина). Срок опыта 48 часов

В анатомо-топографической и гистологической структуре поджелудочной железы человека и экспериментальных животных (кролика) однотипны. При макроскопическом исследовании поджелудочной железы кролика отмечено, что снаружи она покрыта тонкой оболочкой из рыхлой волокнистой соединительной ткани, разделяющей орган на дольки. Гистологическая картина контрольной группы (интактных) ткани поджелудочной железы соответствовала видовой норме [131].



а

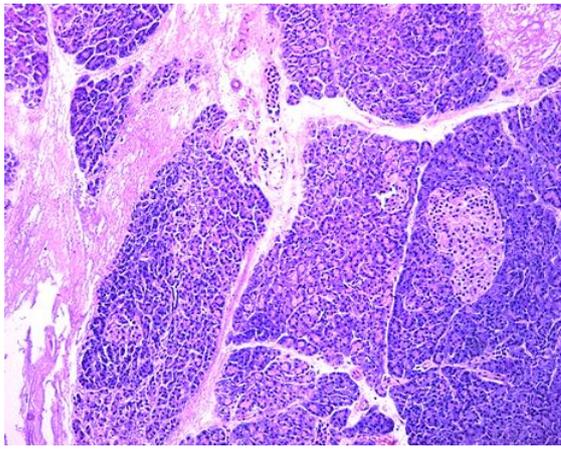


б

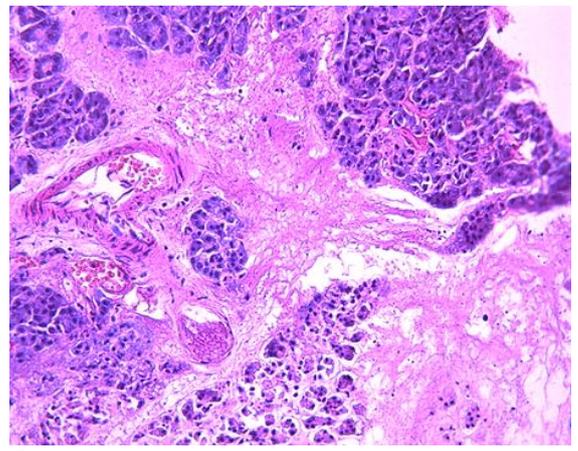
Рисунок 12. Поджелудочная железа кролика (контроль): панкреатические ацинусы (б); островки Лангерганса. Окраска: гематоксилином и эозином. Ув.: а - X100; б – X 400

При гистологическом исследовании экзокринная часть поджелудочной железы кролика представлена панкреатическими дольками, образованными многочисленными панкреатическими ацинусами с секреторными отделами, имеются выводные протоки: вставочные, внутридольковые, междольковые протоки (рисунок 12а). Междольковое пространство представлено волокнами соединительной ткани, где обнаруживаются кровеносные сосуды и междольковые выводные протоки. Эндокринная часть представлена островками округлой формы образованные эндокриноцитами «островки Лангерганса» (рисунок 12б).

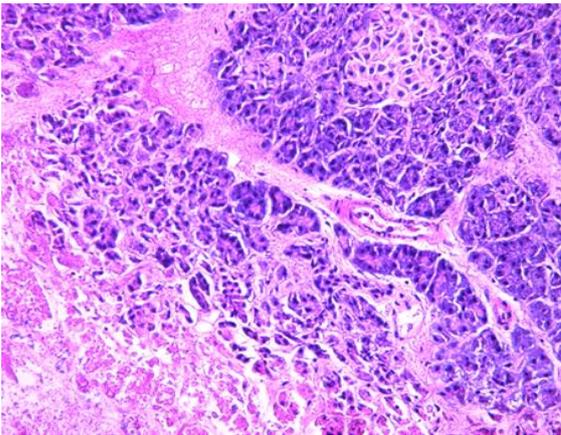
При гистологическом исследовании поджелудочной железы, в срок 12 часов, после завершения эксперимента отмечено нарушение структуры с появлением очагов некробиотических изменений с нечеткими ацинарными структурами, выраженный межклеточный отек (рисунок 13а, б, в), вакуольная дистрофия и некроз паренхимы в виде однородных глыбчатых структур или теневых очертаний ацинусов, очаги кровоизлияний (рисунок 13г, д), при сохранной гистоструктуре выявлялись очаги липоматоза (рисунок 13е).



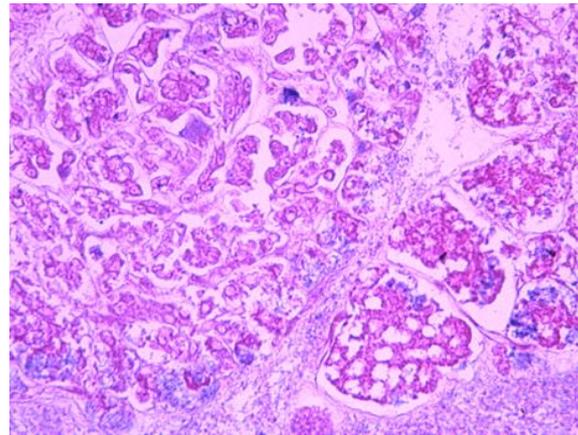
а



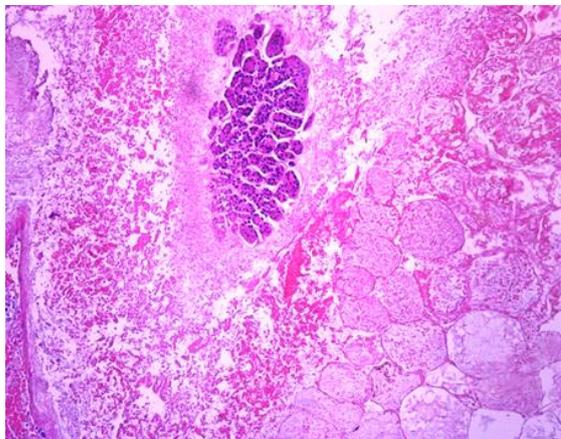
б



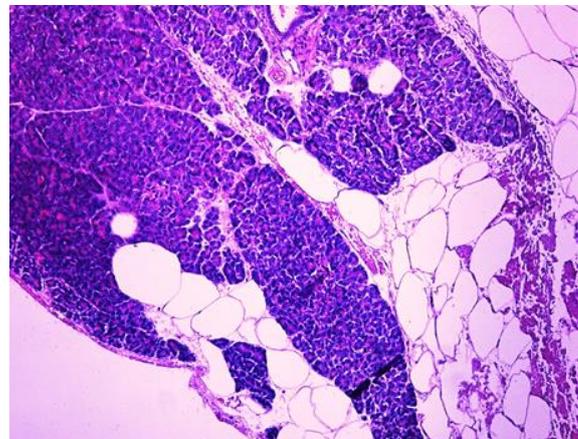
в



г



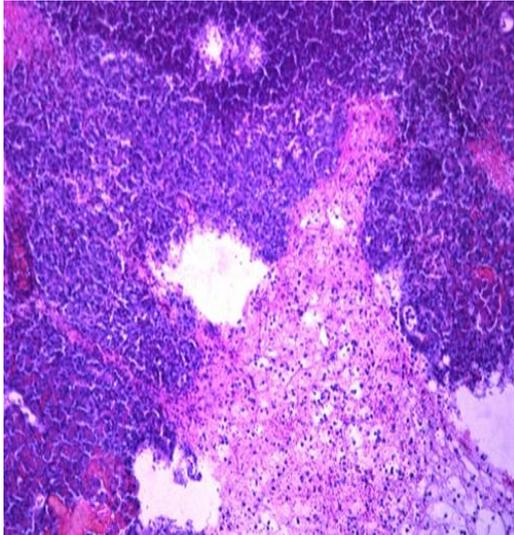
д



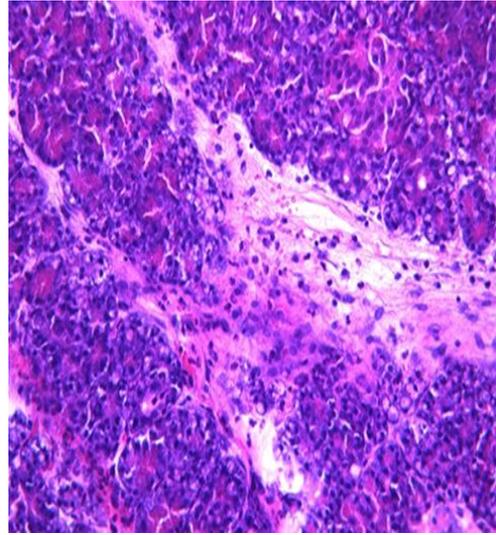
е

Рисунок 13 – Поджелудочная железа, срок - 12 час. Очаговые некробиотические изменения, межуточный отек (а, б, в), некроз ацинарных экзокриноцитов, очаги кровоизлияний (г, д), очаги липоматоза (е). Окраска: гематоксилином и эозином. Ув. X100

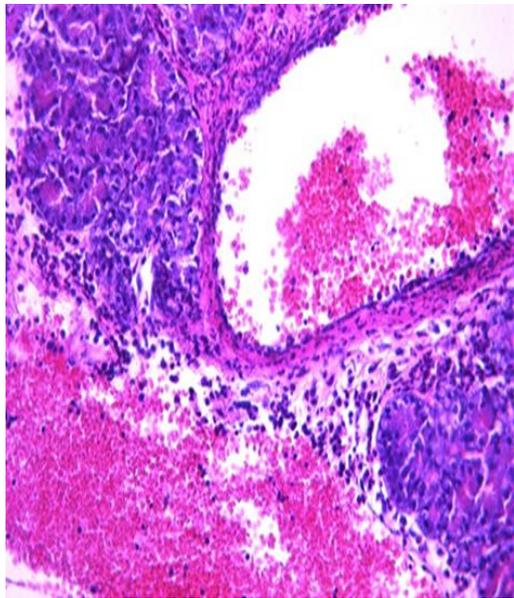
Микроскопическое исследование поджелудочной железы кролика в сроке 24 час после введения аутожелчи отмечается выраженные нарушение гистоструктуры, выраженный межуточный отек, обширные очаги кровоизлияний и диффузной лимфо-лейкоцитарной инфильтрацией и некробиотические изменения паренхимы, выявлялись единичные ацинарные структуры и протоки, расширенные и полнокровные сосуды (рис. 14а, б, в, г).



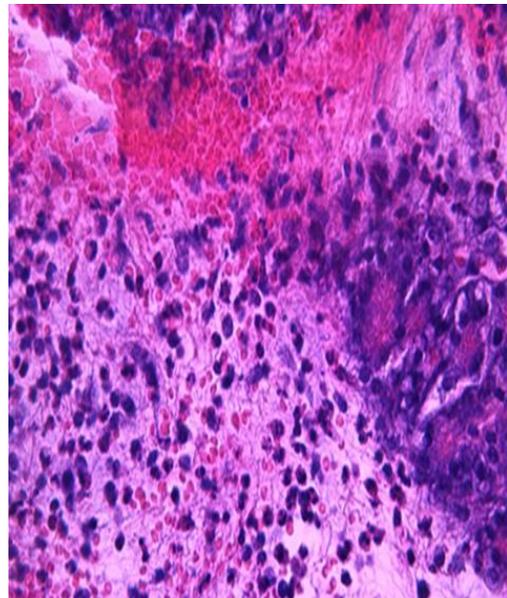
а



б



в



г

Рисунок 14. Поджелудочная железа, срок - 24 часа после введения аутожелчи. Нарушение гистоструктуры: некробиотические изменения ацинарных структур, межуточный отек с диффузной лимфолейкоцитарной инфильтрацией, очаги кровоизлияний и полнокровие сосудов (а, б, в, г) Окраска: гематоксилином и эозином. Ув.: а, б - X100, в, г - X400

Гистологическая картина поджелудочной железы в сроке 48 часов, после завершения эксперимента с введением аутожелчи отмечено нарушение гистоструктуры с обширными участками некроза экзокринных ацинарных структур и протоков, очаги некроза паренхимы в виде однородных, безъядерных очертаний (рисунок 15а, б, в, г), в других участках - жировая вакуольная дистрофия и очаги липоматоза (рисунок 15д, е).

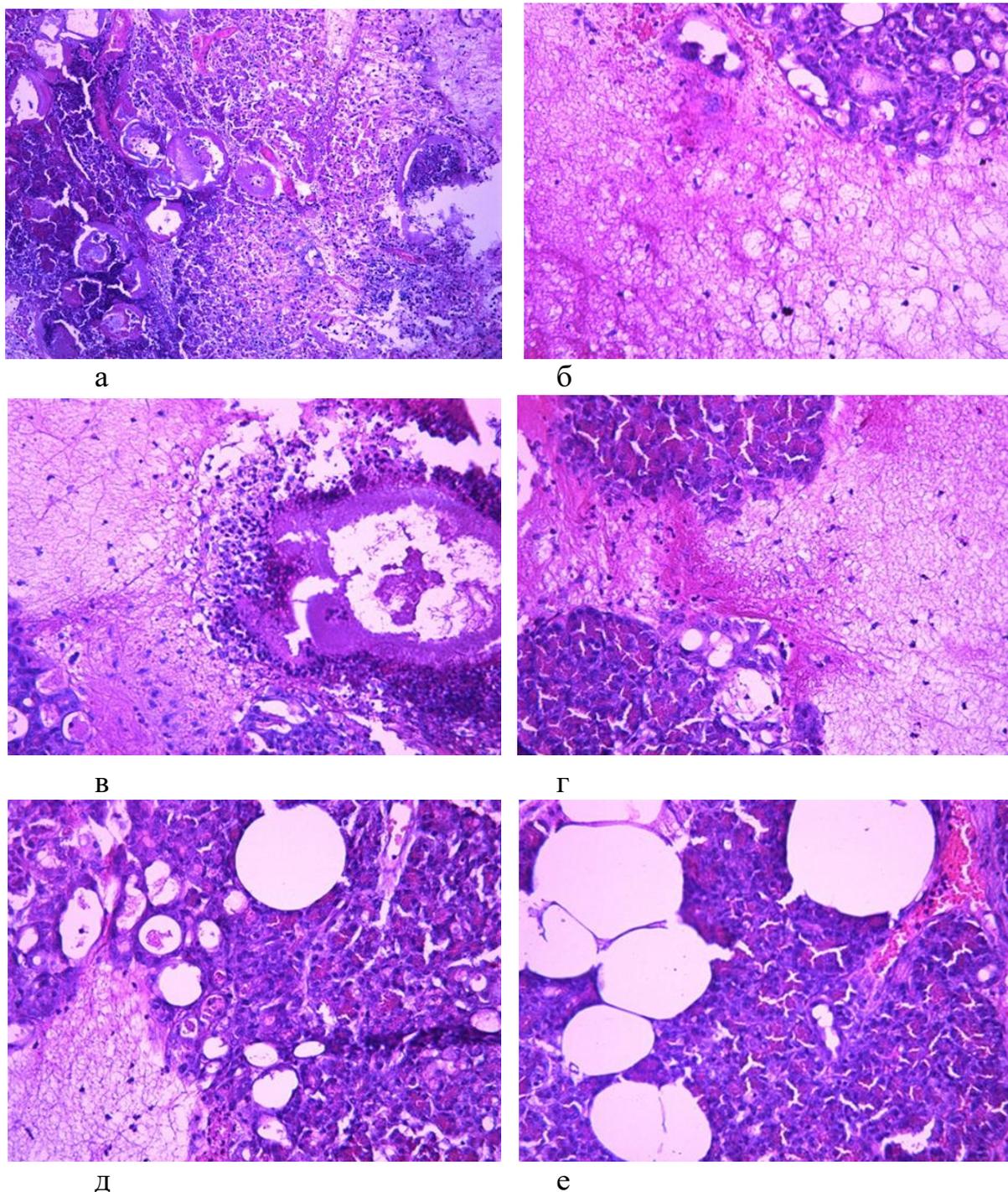


Рисунок 15. Поджелудочная железа, срок - 48 час. Нарушение структуры с обширными участками некроза (а, б, в,г), очаги липоматоза (д, е). Окраска: гематоксилином и эозином. Ув.: а, б- X100, в, г, д, е - X200

При сроке 12 ч после завершения эксперимента макроскопически отмечалось полнокровие сосудов капсулы и очаги кровоизлияний в зоне введения аутожелчи, размеры органа не претерпевали резких изменений. Гистологическая картина характеризовалась появлением очагов некробиотических изменений.

При сроке 24 ч после завершения эксперимента железа уменьшалась в размерах, гистологически отмечалось нарушение гистоструктуры органа, диффузная лимфо-лейкоцитарная инфильтрация и некробиотические изменения паренхимы.

При сроке 48 ч после завершения эксперимента макроскопически железа резко уменьшалась в размерах, прослеживались множественные очаги кровоизлияний, очаги нагноения, гистологически отмечалось обширные участки некроза экзокринного аппарата и очаги некроза паренхимы в виде однородных, безъядерных очертаний.

Эти данные свидетельствуют, что развитие панкреонекроза имеет стадийный характер. В начальной фазе панкреонекроз характеризуется острым отеком ПЖ. В прогрессирующей фазе панкреонекроза в зависимости от преобладания тех или иных ферментов, развивается колликвационный некроз ацинарной ткани, под влиянием протеолитических ферментов, или коагуляционный некроз ацинарной и жировой ткани под влиянием панкреатической липазы, возникает тромбоз макро и микрососудистого русла.

Таким образом, представленная модель расценена как состоятельная для воспроизведения панкреонекроза в эксперименте с наименее агрессивной хирургической техникой выполнения.

3.2 Выбор охлаждающего агента для наложения искусственной локальной гипотермии (стендовый эксперимент).

Выбор охлаждающего агента. При создании гипотермии нами преследовалась цель создания условия, приближенные к парабиозу, при котором функциональные свойства органа временно затормаживаются. Именно длительность гипотермии и соответственно стойкость торможения функционирования органа являлся основным критерием эффективности исследования.

Создавалась модель брюшной полости: в термостат, поддерживающий постоянную температуру (38° С), соответствующую температуре брюшной полости кролика, помещали говяжью печень, далее на печени размещали охлаждающие материалы: аккумулятор холода, твёрдый диоксид углерода, обычный лед (рисунок 16а). Контроль температуры осуществлялся с помощью пирометра, измерения проводили каждые 30 секунд (рисунок 16б). По достижению биологической тканью температуры 38° С измерения останавливали.



а



б

Рисунок 16. Биологическая ткань - говяжья печень, помещенная в термостат, имитирующий брюшной полости (а); процесс динамической термометрии в области укладки охлаждающего агента на биологическую ткань, помещенную в термостат (б)

Следует отметить тот факт, что наложение сухого льда на биологическую ткань приводит к поверхностной кристаллизации в месте наложения данного охлаждающего агента, что может быть обусловлено крайне низкой собственной (независящей от температуры хранения) температуры вещества (рисунок 17).



Рисунок 17. Результат воздействия сухого льда с участками локальной кристаллизации ткани в месте приложения охлаждающего агента

Результаты измерения температуры в динамике для каждого изучаемого охлаждающего агента заносились в таблицу 3, что показано ниже.

Таблица 3 – Динамика изменения температуры биоткани в термостате в зависимости от типа наложенного охлаждающего агента

Время	Температура °С		
	Аккумулятор холода	Сухой лед	Обычный лед
0:00:30	25,6	20	34
0:01:00	24,8	21	35,8
0:01:30	25,4	22	35,3
0:02:00	25,2	23	37
0:02:30	26	23,4	38
0:03:00	26,8	24,4	38,3
0:03:30	27	25	38,0
0:04:00	27,2	25,7	
0:04:30	27,3	29	
0:05:00	27,2	30	
0:05:30	27,1	31	
0:06:00	26	32	
0:06:30	26,2	33,5	
0:07:00	26,7	35	
0:07:30	28	34,3	
0:08:00	28,8	36,5	
0:08:30	28,8	37,3	
0:09:00	31,7	37,6	
0:09:30	32,7	38,0	
0:10:00	33,1		
0:10:30	32,9		
0:11:00	33,7		
0:11:30	34,4		
0:12:00	34,7		
0:12:30	35,3		
0:13:00	35,4		
0:13:30	35,3		
0:14:00	35,6		
0:14:30	36,9		
0:15:00	37,2		
0:15:30	38,0		

Согласно данным представленным в таблице 3, в начальной точке опыта максимальным охлаждающим эффектом из трех охлаждающих агентов обладает твердый диоксид углерода, который снижает температуру биоткани до 20⁰С за первые 30 секунд (при том, что исходная температура поверхности ткани для всех 3 агентов одинакова и равна 38⁰С). Минимальным

охлаждающим эффектом обладает лёд – результат его охлаждающего эффекта снижение температуры до $34,0^{\circ}\text{C}$ за аналогичный отрезок времени. Аккумулятор холода обладает выраженным охлаждающим эффектом за первые 30 секунд, результат его воздействия составил охлаждение поверхности биологической ткани до $25,6^{\circ}\text{C}$.

Из трёх материалов наибольшую длительность охлаждения показал аккумулятор холода (карбоксиметилцеллюлоза), имеющий продолжительную фазу температурного плато, что оценивается как состояние гипотермии. Наиболее низкие температуры охлаждения биологической ткани показал сухой лёд, но эффект оказался непродолжительным (около 8 минут), также, как отмечалось ранее, имеются изменения биологической ткани в виде ее локальной кристаллизации в месте наложения агента. Наиболее неудовлетворительные результаты отмечаются при наложении льда (H_2O), градиент температуры составил всего 4°C , а экспозиция гипотермии не более 3 минут, что представлено на (рисунке 18).

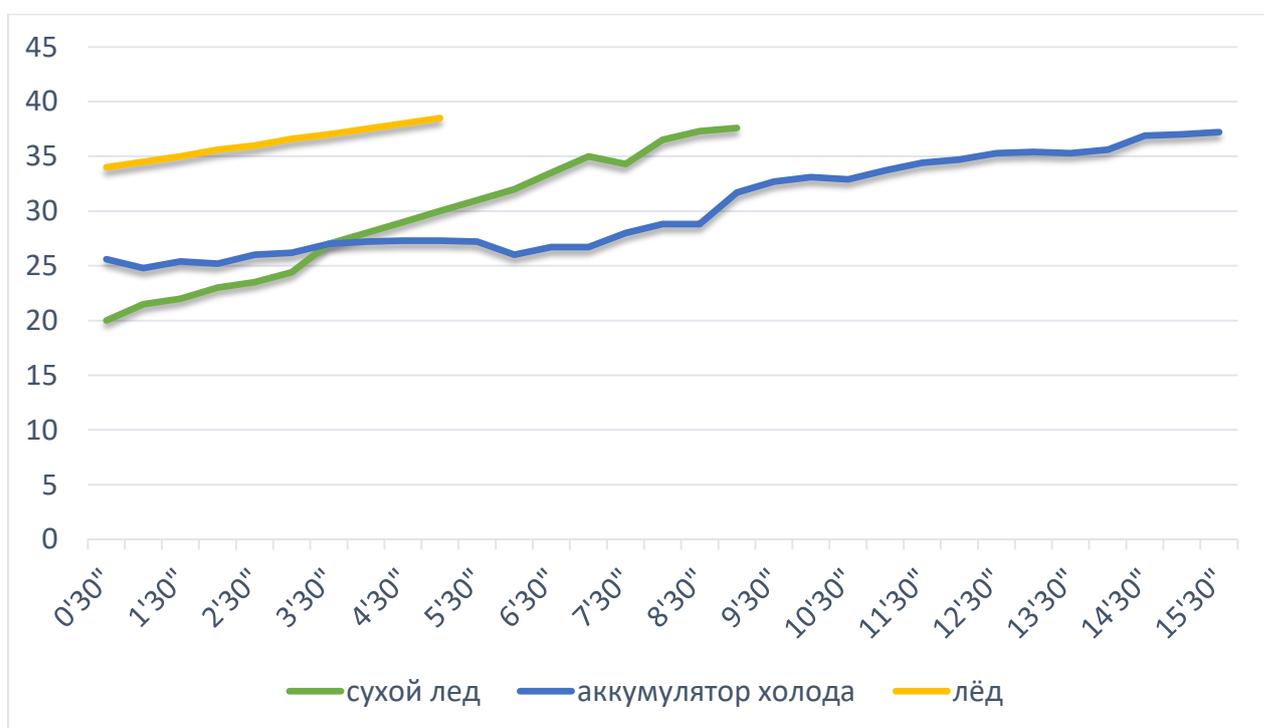


Рисунок 18. Динамика изменение температуры биоткани с течением времени, в зависимости от вида наложенного охлаждающего агента

Аккумулятор холода – это водный раствор карбоксиметилцеллюлозы, обладающий большой теплоёмкостью. Может быть использован для транспортировки и хранения вакцин, препаратов, биологических тканей. Начальная температура аккумулятора холода зависит от температуры его хранения. В нашем опыте охлаждающие вещества хранились при температуре -17°C (стандартная температура бытовой морозильной камеры).

По результатам стендового эксперимента сделан вывод о том, что из трех представленных охлаждающих агентов для наложения ИЛГ наиболее целесообразно использовать аккумулятор холода, так как его свойство поддерживать низкую температуру в месте наложения в течение длительного времени оптимально для оценки терапевтического эффекта гипотермии на морфогенез заболевания.

3.3 Искусственная локальная гипотермия поджелудочной железы аккумулятором холода на модели панкреонекроза

Методика наложения локальной гипотермии была отработана на 18 беспородных кроликах.

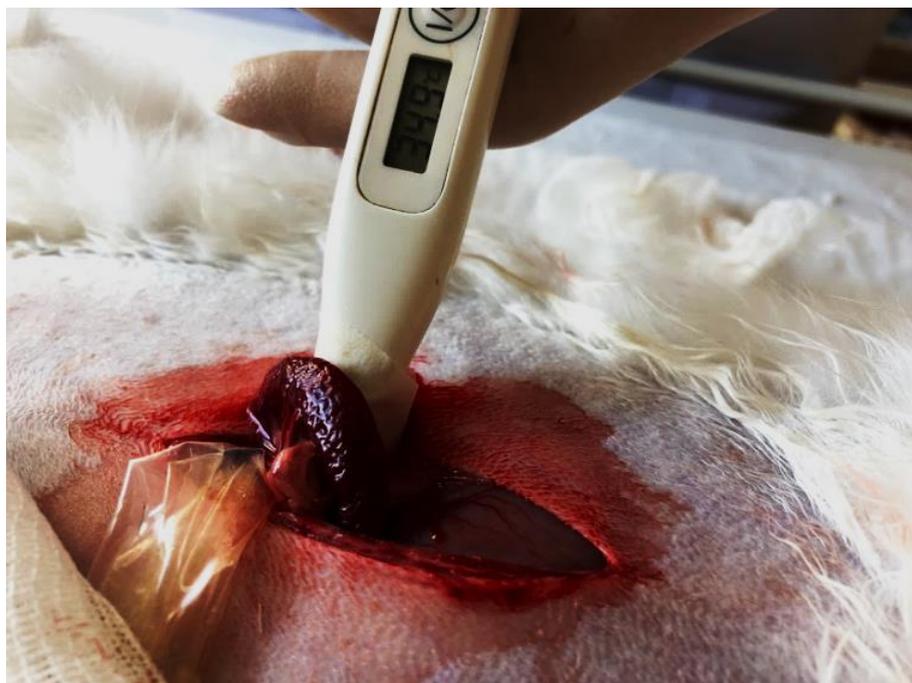
Этапы операции. После премедикации под внутривенным наркозом производилась средне срединная лапаротомия. Производилась описанная в разделе 3.1. индукция панкреонекроза. Вкратце: отыскивался желчный пузырь и инсулиновым шприцом набиралась желчь, которую вводили по 0,1 мл в правую и левую лопасть поджелудочной железы (рисунок 19а).



а



б



В

Рисунок 19. Ход выполнения операции. введение желчи в поджелудочную железу (а); наложение локальной гипотермии (б); измерение температуры (в)

После завершения этапа индукции панкреонекроза переходили к этапу наложения искусственной локальной гипотермии. Интраоперационно в брюшную полость в область поджелудочной железы погружали охлаждающий агент (аккумулятор холода), заранее помещенный в стерильный контейнер (презерватив), соответственно рисунку 19б. Экспозиция ИЛГ составляла не менее 20 минут. В область наложения локальной гипотермии помещался электронный термометр для контроля температуры в месте приложения источника охлаждения (рисунок 19в). Далее с достижением температуры выше 38°C , но не ранее 20 минут, контейнер извлекался. После чего производилось послойное ушивание раны. В заключении операции обработка раны ветеринарным кожным антисептиком.

Выведение из эксперимента производили в сроки в установленные сроки, согласно разработанному дизайну исследования. После этого осуществляли забор внутренних органов для морфологического исследования. Поджелудочную железу извлекали целиком, описывали макроскопическую картину и фиксировали в 10% нейтральном формалине. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, исследовали методом световой микроскопии. Полученные результаты сравнивали с результатами контрольной группы животных без лечения.

Таким образом методика проста и эффективна, разработана специально для наложения аккумулятора холода (карбоксиметилцеллюлоза), который ранее был определен в стендовом эксперименте. Процесс охлаждения во время наложения легко динамически контролируется при помощи термометрии. Сама

процедура охлаждения полностью атравматична и исключает инфицирование брюшной полости за счет использования стерильных контейнеров.

3.4 Сравнительная морфологическая характеристика состояния ткани поджелудочной железы при моделировании панкреонекроза

С целью проведения сравнительной характеристики гистологической картины в различных группах эксперимента была выделена контрольная группа интактных животных для морфологической оценки структуры ткани поджелудочной железы.

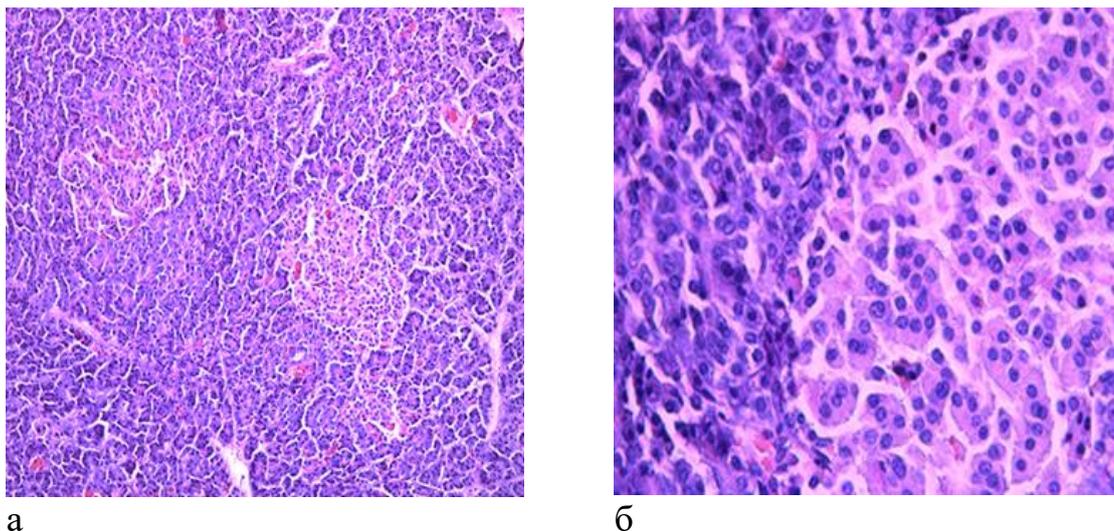
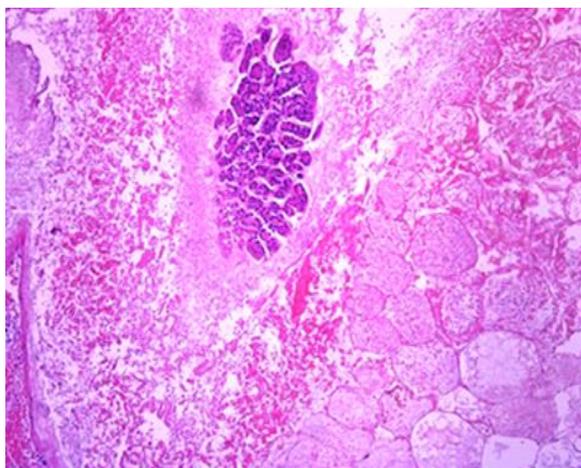


Рисунок 20. Поджелудочная железа кролика (контроль): а – обзорная картина: экзокринная часть представлена панкреатическими дольками и ацинусами; б - эндокринная часть состоит из эндокриноцитов, островков Лангерганса. Окраска: гематоксилином и эозином. Ув.: а - X100; б - X 400

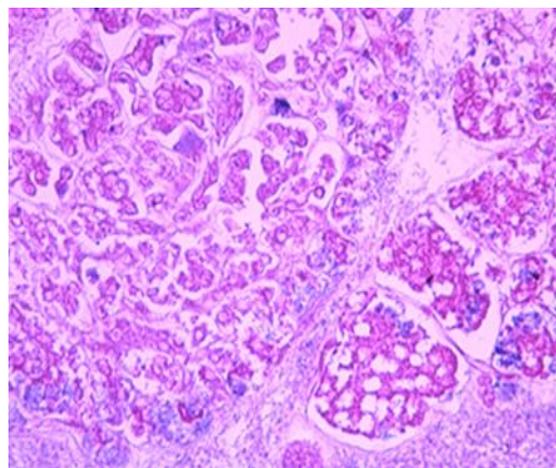
При гистологическом исследовании ткани поджелудочной железы кролика контрольной группы соответствовала видовой норме. Ткань органа микроскопически была представлена экзокринной частью поджелудочной железы, состоящая из панкреатических долек, образованными многочисленными панкреатическими ацинусами с секреторными отделами, имеющие выводные протоки: вставочные, внутридольковые, междольковые протоки. Междольковое пространство панкреатических долек представлено волокнами соединительной ткани, где обнаруживаются кровеносные сосуды и междольковые выводные протоки. Эндокринная часть представлена островками округлой формы образованные эндокриноцитами «островки Лангерганса» (рисунок 20а, б).

3.4.1 Морфологическая характеристика поджелудочной железы на модели панкреонекроза с введением аутожелчи в разные сроки эксперимента

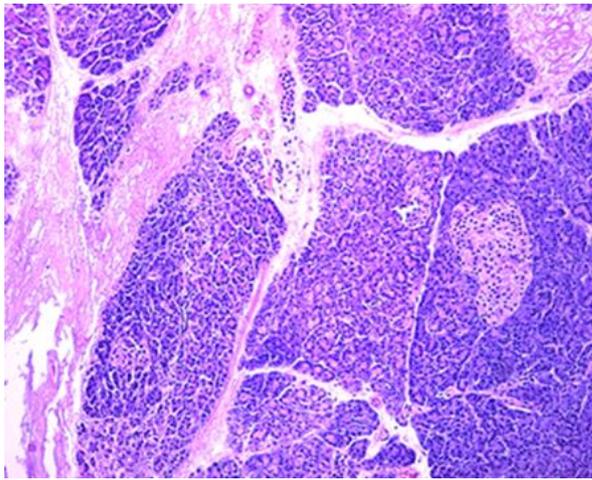
В первой группе наблюдений, в срок 12 часов после завершения эксперимента при моделировании панкреонекроза с введением аутожелчи при гистологическом исследовании поджелудочной железы отмечено нарушение гистоструктуры с появлением очагов некробиотических изменений с нечеткими ацинарными структурами, межуточный отек, вакуольная дистрофия и некроз паренхимы в виде формирования однородных глыбчатых безъядерных, или же вакуолизированных структур, или же теневых образований неправильных округлых форм розового цвета, представляющие очертания некротизированных ацинусов, имелись очаги кровоизлияний (рисунок 21а, б), в некоторых участках сохранной гистоструктуры выявлялись очаги и участки панкреатических долек и островков Лангерганса (рисунок 21в, г), встречались также очаги липоматоза, что может быть в ткани поджелудочной железы интактных животных.



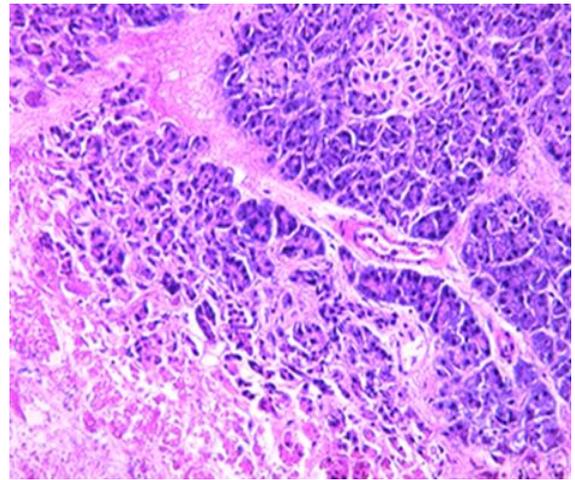
а



б



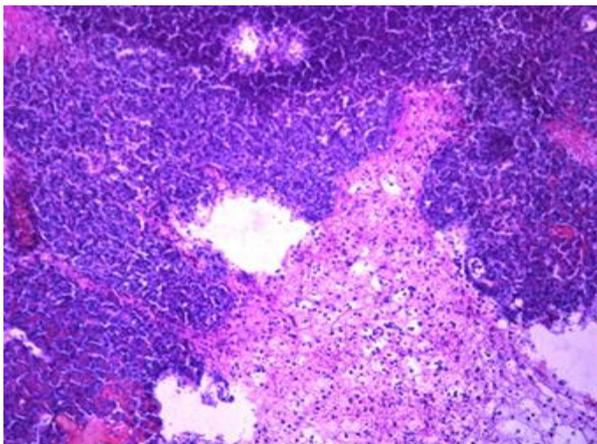
В



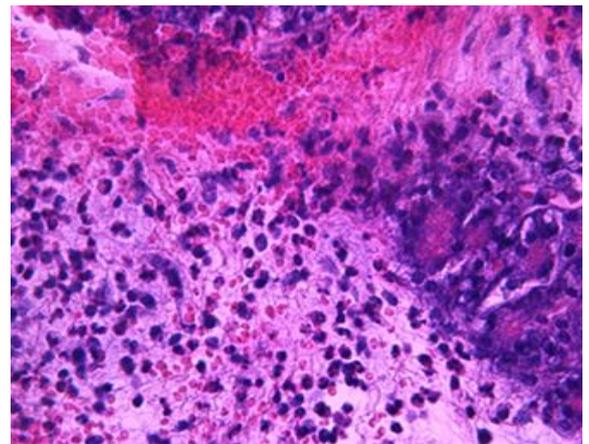
Г

Рисунок 21. Поджелудочная железа. Срок - 12 часов. Модель панкреонекроза с введением аутожелчи: а, б - обширные некротические изменения ткани; в, г - выраженный межклеточный отек, очаги кровоизлияний, участки сохранности панкреатических долек и островков Лангерганса. Окраска: гематоксилином и эозином. Ув.: а, б, в - X100

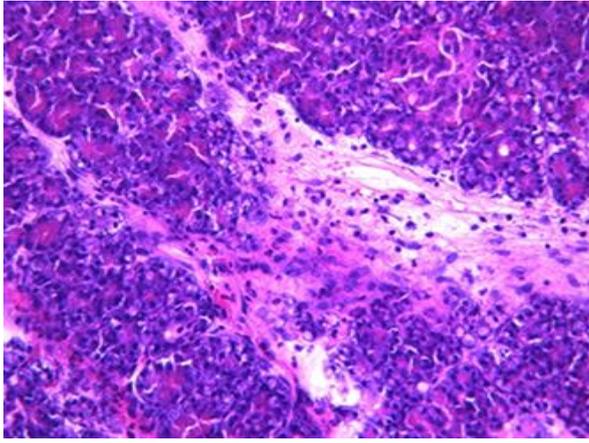
Микроскопическое исследование поджелудочной железы кролика в сроке 24 часа с моделированием панкреонекроза с введением аутожелчи отмечается выраженные нарушение гистоструктуры. При этом наблюдается выраженный межклеточный отек, распространенные некротические изменения паренхимы, диффузная лимфо-лейкоцитарная инфильтрация стромы и обширные очаги кровоизлияний, а также в зоне некробиотических изменений паренхимы выявлялись единичные островки из сохранившихся структур панкреатических ацинусов, расширенные протоки, полнокровные сосуды и очаги кровоизлияний (рисунок 22).



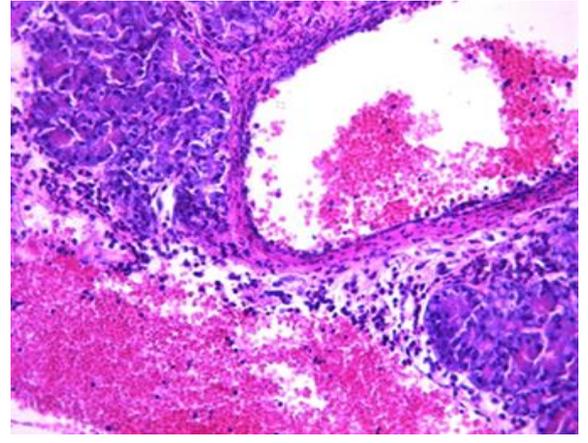
а



б



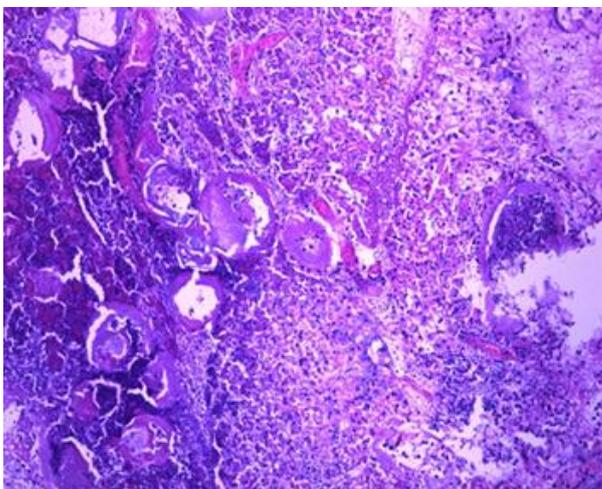
В



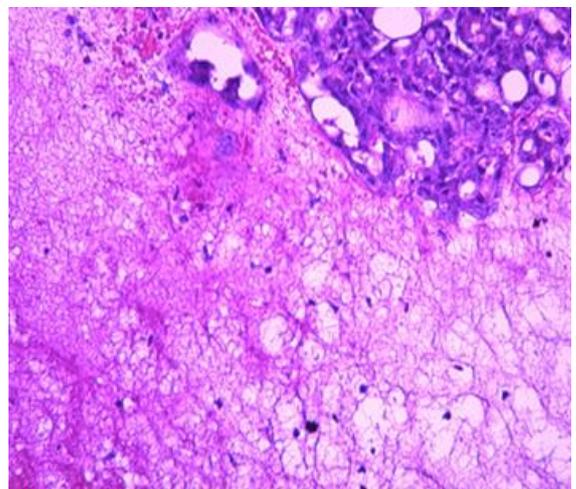
Г

Рисунок 22. Поджелудочная железа. Срок - 24 часа. Модель панкреонекроза с введением аутожелчи. Нарушение гистоструктуры: некробиотические изменения ацинарных структур, межуточный отек с диффузной лимфо-лейкоцитарной инфильтрацией, очаги кровоизлияний и полнокровие сосудов (а, б, в, г). Окраска: гематоксилином и эозином. Ув.: а, г – X 100, в, г – X 200

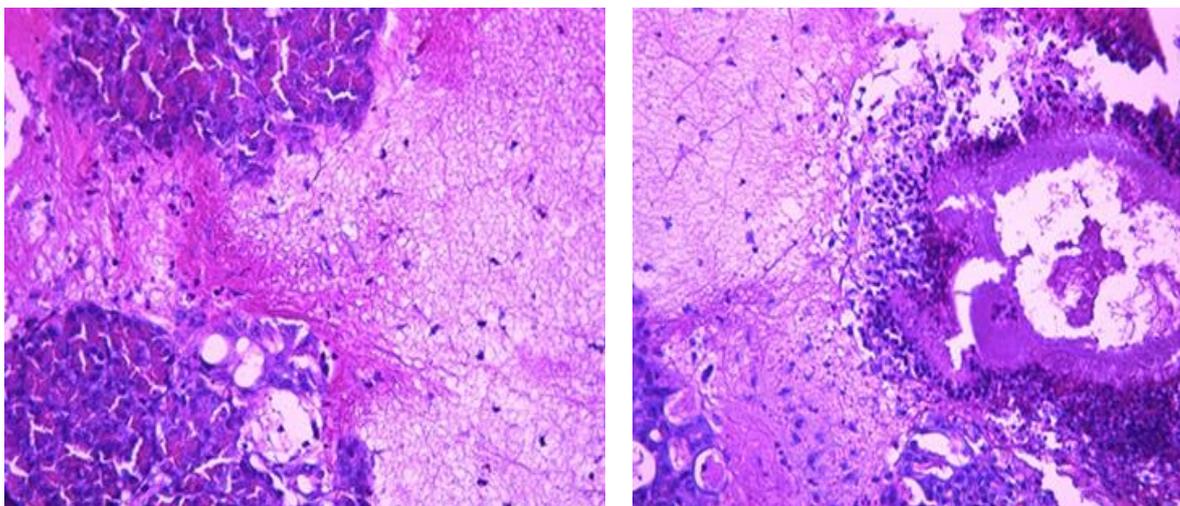
В срок 48 часов после завершения эксперимента при моделировании панкреонекроза с введением аутожелчи гистологическая картина поджелудочной железы характеризовалась выраженным нарушением её гистоструктуры. Микроскопические изменения проявлялись образованием обширных участков некробиотических изменений экзокринных ацинарных структур и протоков, которые состоят из очагов некроза паренхимы в виде однородных округлых структур и кольцевидных безъядерных образований однородно-розового цвета с островками сохранной ткани (рис. 23а, б, в, г), в других участках железы отмечались очаги вакуолизации, зоны коагуляционного некроза. В пограничной зоне некроза четко прослеживается зона демаркационного воспаления в виде диффузной лимфо-лейкоцитарной инфильтрации (рисунок 23а).



а



б



В

Г

Рисунок 23. Поджелудочная железа, срок - 48 час модель панкреонекроза с введением аутожелчи. Нарушение гистоструктуры поджелудочной железы: а – зона демаркационного воспаления с выраженной лимфоидно-лейкоцитарной инфильтрацией; б, в, г - обширные участки некроза в виде безъядерных структур однородно-розового цвета с островками сохранной ткани. Окраска: гематоксилином и эозином. Ув.: а, б- X 100, в, г – X 200

Таким образом, выявленные морфологические изменения ткани поджелудочной железы при моделировании панкреонекроза с введением аутожелчи показали, что происходит образование обширных некротических процессов паренхимы поджелудочной железы, выраженный межучный отек и распространенные очаги кровоизлияний, полнокровие сосудов, а также выявляются отдельные островки ацинарных структур при очаговой сохранности отдельных фрагментов панкреатических долек.

3.4.2 Морфологическая характеристика поджелудочной железы на модели панкреонекроза с проведением искусственной локальной гипотермии в разные сроки эксперимента

В группе животных с моделированием панкреонекроза с проведением искусственной локальной гипотермии (ИЛГ), в сроке после 12 часов завершения эксперимента отмечено, что гистоструктура поджелудочной железы сохранена. При микроскопическом исследовании отмечено сохранность общей гистоструктуры железы, четко прослеживаются ацинарные структуры, протоки, наблюдается межучный отек, умеренная лимфоидная инфильтрация и полнокровие сосудов (рисунок 24).

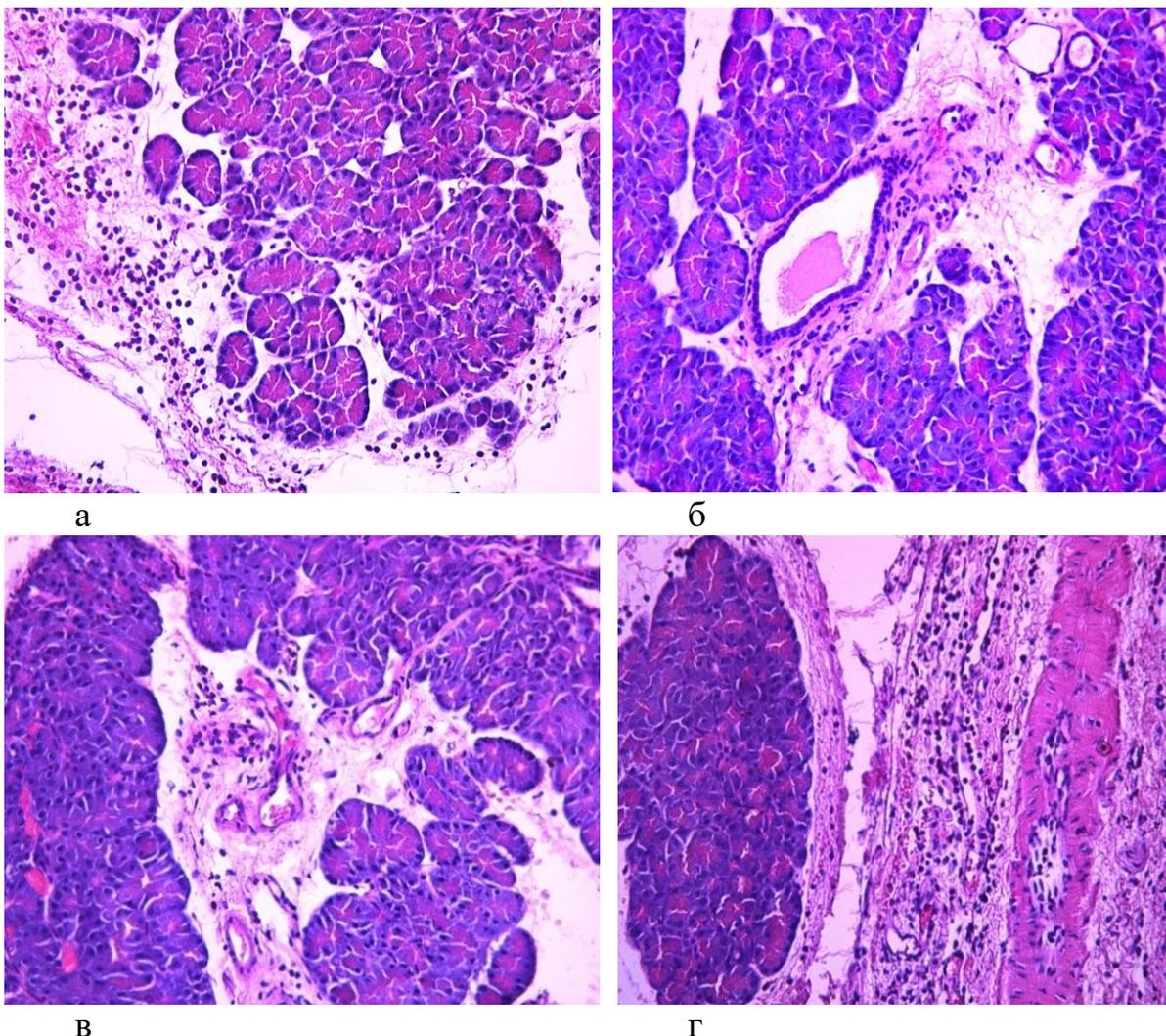


Рисунок 24. Поджелудочная железа. Срок – 12 часов. Модель панкреонекроза с проведением ИЛГ. Общая гистоструктура ткани железы сохранена, отмечается межучный перидуктальной и периваскулярной отек, лимфоидная инфильтрация интерстиция. Окраска: гематоксилином и эозином. Ув.: а - X100; б, в, г – X 200

В срок 24 часа при моделировании панкреонекроза с проведением искусственной локальной гипотермии в ткани поджелудочной железы на значительном протяжении структура паренхимы сохранена, хорошо прослеживаются островки Лангерганса (рисунок 25б); отмечается межучный отек и лимфо-лейкоцитарная инфильтрация, полнокровие сосудов (рисунок 25).

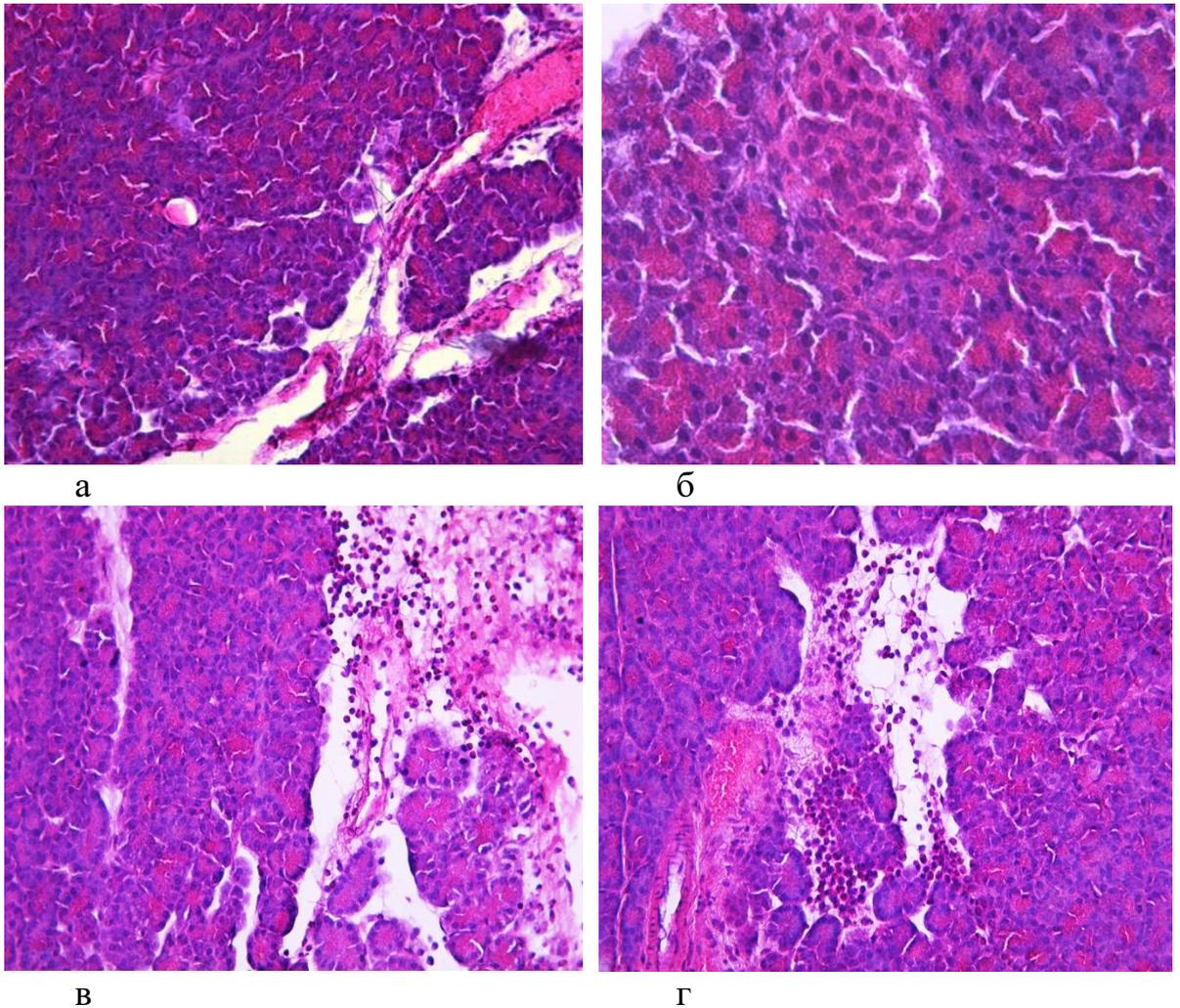
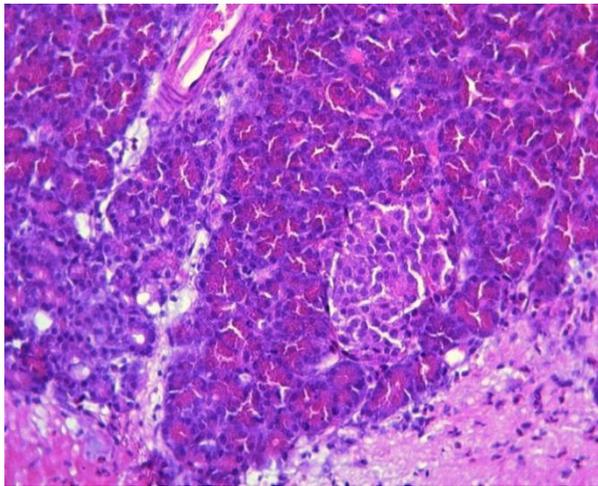
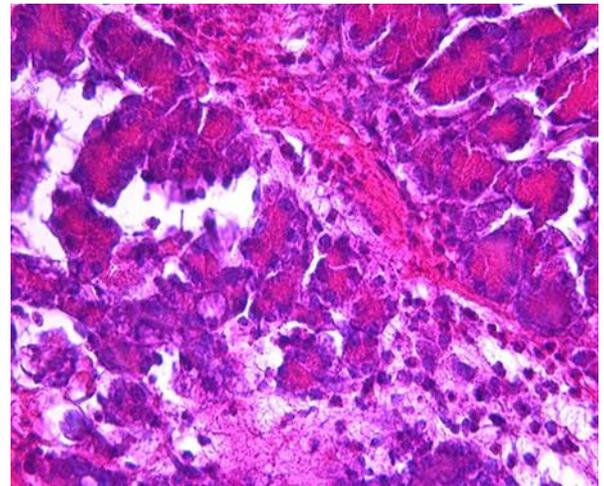


Рисунок 25. Поджелудочная железа. Срок – 24 часа. Модель панкреонекроза с проведением ИЛГ. На значительном протяжении отмечается сохранность паренхимы поджелудочной железы и островков Лангерганса (а, б); межлочный отек, полнокровие сосудов, умеренная лимфоцитарная инфильтрация (в, г). Окраска: гематоксилином и эозином. Ув.: а, в, г –Х 200; б –Х 400.

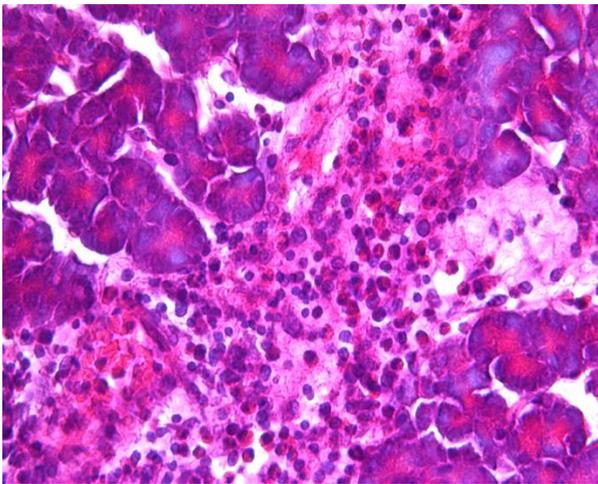
В сроке 48 часов, в группе животных с моделированием панкреонекроза и проведением искусственной локальной гипотермии поджелудочная железа ткань органа сохраняла общую гистологическую структуру, в этот срок эксперимента наблюдается межлочный отек, лимфоцитарная инфильтрация с примесью единичных эозинофилов, полнокровие сосудов (рисунок 26а, б, в). Следует отметить, что выявлялись пограничные участки, четко отграниченные, это зоны демаркации между сохранной тканью и участками панкреонекроза, в виде однородно розового цвета участками безъядерных вакуолизированных структур (рисунок 26г).



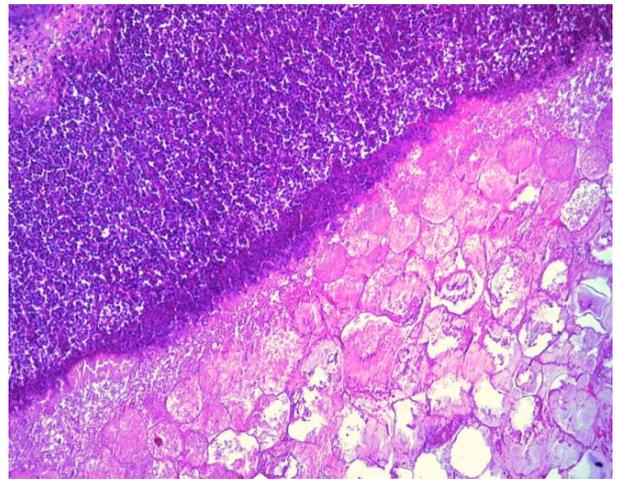
а



б



в



г

Рисунок 26. Поджелудочная железа. Срок – 48 часов. Модель панкреонекроза с ИЛГ. Гистоструктура поджелудочной железы сохранена, наблюдается межлочный отек, лимфоцитарная инфильтрация с примесью единичных эозинофилов, полнокровие сосудов (а, б). Окраска: гематоксилином и эозином. Ув.: X 400

Таким образом, выявленные морфологические изменения ткани поджелудочной железы при моделировании панкреонекроза с проведением искусственной локальной гипотермии органа показали, что не зависимо от срока завершения эксперимента микроскопически характерно сохранение гистологической структуры, как экзокринной части, так и эндокринного компонента. При этом наблюдается межлочный отек, лимфоцитарная инфильтрация с примесью единичных эозинофилов и полнокровие сосудов. В пограничных зонах отмечалось четкое разграничение зоны демаркационного воспаления между сохраненными структурами поджелудочной железы и зоны некробиотических изменений.

3.4.3 Морфометрическая оценка структурных изменений поджелудочной железы на моделях панкреонекроза в группах с введением аутожелчи и с проведением искусственной локальной гипотермии в разные сроки эксперимента

Для проведения сравнительного анализа структурных компонентов ткани поджелудочной железы на моделях панкреонекроза в группах с введением аутожелчи и с проведением искусственной локальной гипотермии в разные сроки эксперимента было проведено морфометрическое исследование и дана оценка показателей, характеризующих состояние ядерной субстанции (кариопикноз, кариорексис, кариолизис), распространенность дистрофических изменений и его вида, состояние межучной волокнистой ткани, наличие очагов липоматоза, некроза и её распространенность.

Каждый показатель оценивался по балльной системе, что представлено на таблицах 4, 5.

Оценка основных показателей состояния структурных компонентов поджелудочной железы по балльной системе осуществляется следующим образом:

0 баллов – сохранность гистоструктуры ткани поджелудочной железы, без изменений в ядре и цитоплазме клеток.

1 балл – общая гистоструктура ткани сохранена, но имеются единичные изменения: зернистая дистрофия, пылевидная жировая дистрофия, единичные апоптолические клетки ацинуса, единичные форменные элементы крови, без формирования воспалительного инфильтрата.

2 балла – нарушение гистоструктуры ткани, со структурными изменениями: гидropическая дистрофия, очаговая мелкокапельная жировая дистрофия, фокальные очаги некроза, множественные форменные элементы крови, с формирования очагового воспалительного инфильтрата.

3 балла – выраженные структурные изменения в ацинусах и межучной ткани поджелудочной железы: дистрофические изменения как вакуольная, баллонная дистрофия, диффузная крупнокапельная жировая дистрофия, тотальный некроз, распространенные очаги липоматоза, кровоизлияний и диффузная воспалительная инфильтрация.

Для сравнительной оценки гистологических изменений согласно предложенной балльной системы был использован точный критерий Фишера, используемый для определения достоверности различия между независимыми группами по качественным показателям.

Результаты полуколичественной оценки изменений гистологической структуры ткани поджелудочной железы в исследуемых группах с панкреонекрозом и моделированием панкреонекроза с наложением искусственной локальной гипотермии представлен в таблицах 4 и 5. Таблицы отображают данные сравнения по каждому из оцениваемых параметров в сроки 12, 24 и 48 часов. Для достоверной оценки сравнение проводилось попарно в соответствующие временные промежутки в двух исследуемых группах.

Таблица 4 Оценка структурных изменений компонентов ацинусов поджелудочной железы в группах эксперимента

Структурные элементы	Панкреонекроз			Панкреонекроз + гипотермия			p		
	Сроки опыта (в часах)			Сроки опыта (в часах)			Сроки опыта (в часах)		
	12 (n=6)	24 (n=6)	48 (n=6)	12 (n=6)	24 (n=6)	48 (n=6)	12	24	48
Изменение ядра									
без изменений	0	0	0	4	2	2	0,03	0,22	0,22
кариопикноз	4	0	0	2	4	4	0,3	0,03	0,03
кариорексис	2	3	1	0	0	0	0,22	0,09	0,05
кариолизис	0	3	5	0	0	0	1,0	0,09	0,007
Белковая дистрофия									
без изменений	0	0	0	5	1	4	0,007	0,5	0,03
зернистая	2	1	1	4	5	2	0,3	0,12	0,59
гидропическая	4	4	4	0	0	0	0,03	0,03	0,03
баллонная	0	1	1	0	0	0	1,0	0,5	0,5
Жировая дистрофия									
без изменений	0	0	0	4	5	2	0,03	0,007	0,22
пылевидная	3	1	0	2	1	4	0,62	1,0	0,03
мелкокапельная	3	2	2	0	0	0	0,09	0,22	0,22
крупнокапельная	0	3	4	0	0	0	1,0	0,09	0,03
Некроз ацинусов									
без изменений	0	0	0	6	5	3	0,001	0,007	0,09
единичные	3	0	0	0	1	3	0,09	0,05	0,09
Фокальные (более ½)	3	4	1	0	0	0	0,09	0,03	0,05
тотальный	0	2	5	0	0	0	1,0	0,22	0,007
Примечание: p- точный критерий Фишера; p>1,0 – при равном количестве наблюдений в сравниваемых группах									

Данные представленные в таблице 4 свидетельствуют о достоверных различиях в состоянии структурных элементов ацинусов ткани поджелудочной железы между группами с панкреонекрозом и моделированием панкреонекроза и наложением холодового воздействия. Так под влиянием гипотермии состояние ядра по критериям наличия кариопикноза на 12 (p=0,03), 24 (p=0,03) и 48 (p=0,003) часах, а также кариолизиса на 48 (p=0,007) достоверно отличаются часах в обеих группах.

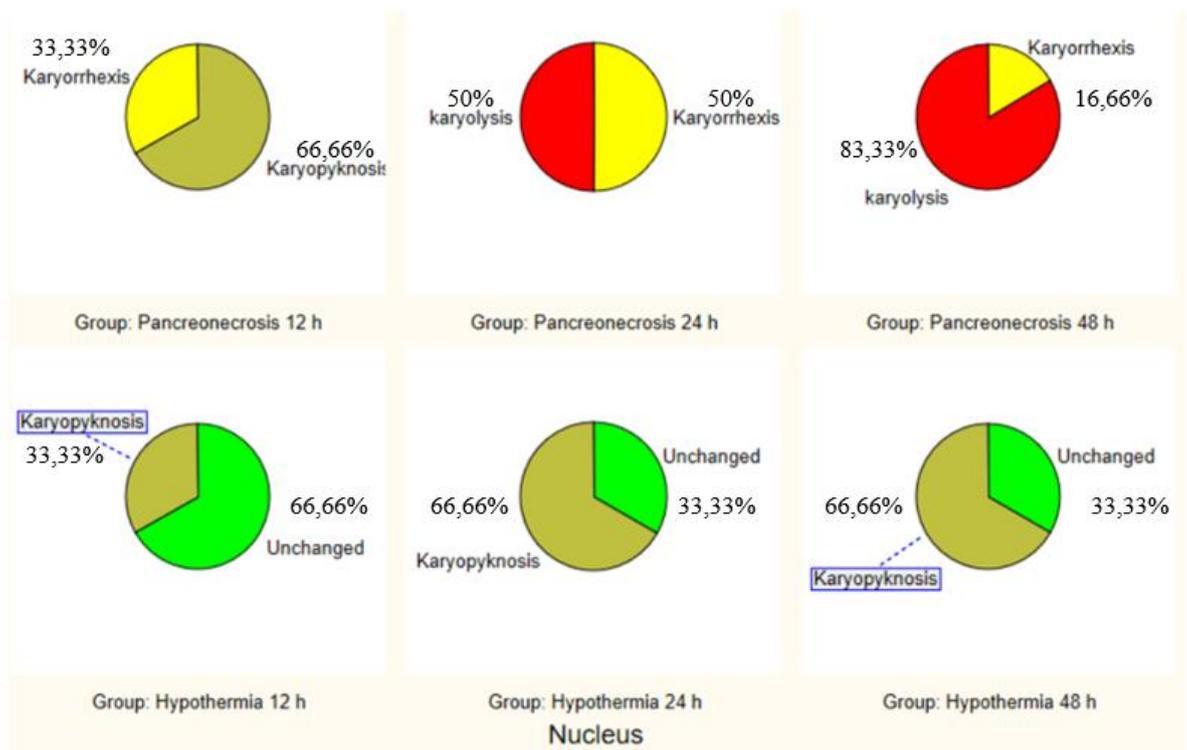


Рисунок 27. Сравнительная характеристика состояния ядра в группах панкреонероз и панкреонекроз+гипотермия на 12, 24 и 48 часах от начала эксперимента

Рисунок 27 наглядно иллюстрирует отличие в состоянии ядерной структуры в зависимости от наличия холодового воздействия на ткань поджелудочной железы. Так, на 48 часах после введения аутожелчи без применения холода отмечается преобладание кариолизиса (83,33%), то есть микроскопически определяется картина безъядерного поля с единичными остаточными ядерными структурами в состоянии кариорексиса (16,66%). В отличие от группы, в которой применялась ИЛГ, где в этом же временном промежутке отмечается в большинстве случаев сморщивание ядра (66,66%), в 33,33% случаев ядро осталось неизменным.

Данные указанные на таблицы 4 свидетельствуют о появлении достоверных межгрупповых различий в дистрофических изменениях ткани поджелудочной железы под влиянием искусственной локальной гипотермии. Так, на 48 часах от начала эксперимента в клетках ткани в группе с моделированием панкреонекроза и без применения холодового воздействия преобладает крупнокапельная жировая дистрофия ($p=0,03$), что может быть расценено как жировое перерождение ткани. В группе же с холодовым воздействием на ткань железы в большей части случаев отмечается лишь пылевидная жировая дистрофия, а также в меньшей части полное отсутствие дистрофических изменений. Также при оценке объема некроза ацинусов ткани поджелудочной железы отмечается достоверные различия по критерию наличия тотального некроза на 48 ($p=0,007$) от начала эксперимента между группами с приложением искусственной локальной гипотермии и без такового.

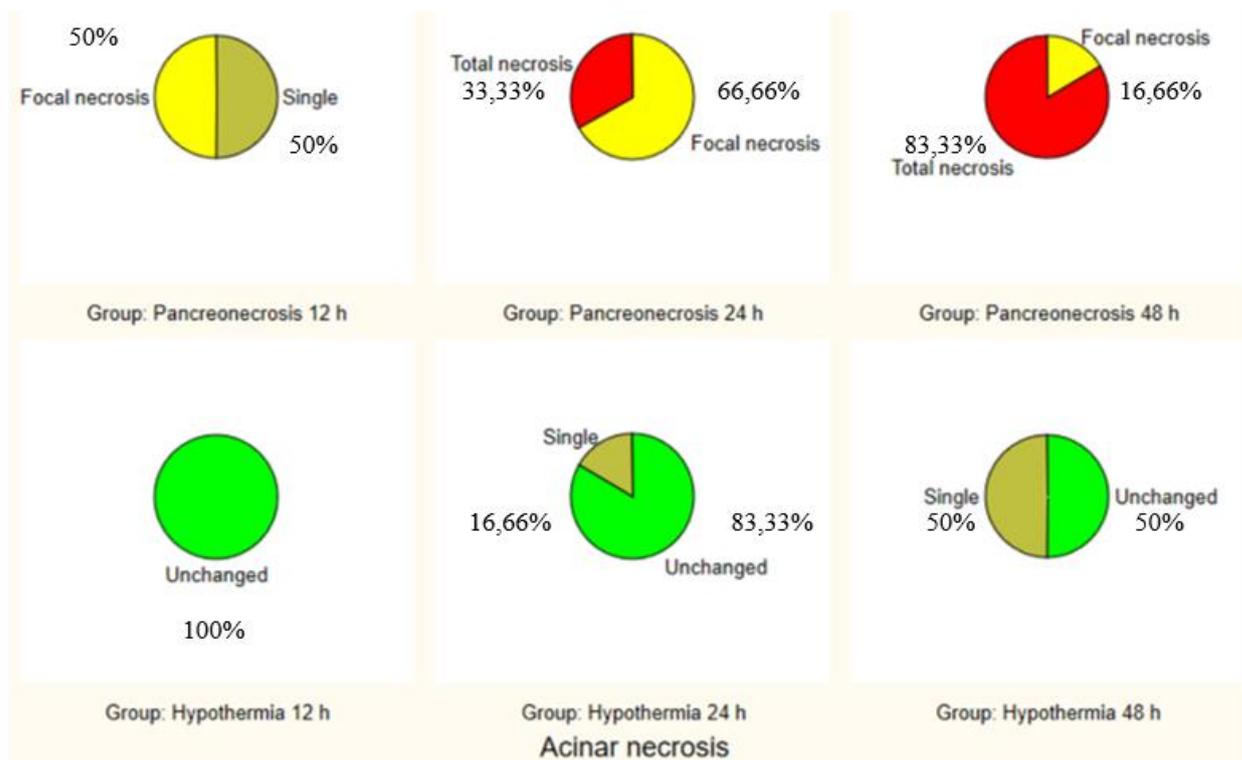


Рисунок 28. Сравнительная характеристика некроза ацинусов в группах панкреонекроз и панкреонекроз+гипотермия на 12, 24 и 48 часах от начала эксперимента

Рисунок 28 иллюстрирует картину ацинарного некроза в двух исследуемых группах. Во временном промежутке 12 часов от начал эксперимента в группе с моделированием панкреонекроза определяются единичные очаги ацинарного некроза в 50% случаев, а в половине случаев определяется фокальный некроз (более $\frac{1}{2}$ ткани в поле зрения). Напротив, в этот же временной промежуток под влиянием ИЛГ ткань остается сохранной (100%) по критерию некроза ацинусов. Если обратится к описанию картины ацинарного некроза на 48 часах от начала эксперимента, то в группе без применения местного воздействия холода преобладает тотальный некроз (83,33%). В группе же с применением ИЛГ в половине случаев ткань остаётся сохранной и лишь в 50% случаев отмечаются единичные очаги некроза ацинусов.

Данные представленные в таблице 5 свидетельствуют о достоверных различиях в состоянии межучочной ткани между группой с моделированием панкреонекроза и группой, в которой моделировался панкреонекроз и проводилось местное охлаждение ткани. Так существуют достоверные различия по характеру отека интерстиция ткани поджелудочной железы на 12 ($p=0,03$) и 24 ($p=0,04$) часах в группе с моделированием панкреонекроза и без применения местного холодное воздействие, где преобладает разлитой характер отека, к 48 ($p=0,03$) часам в этой же группе отек достоверно больше приобретает тотальный характер, в отличие от группы с применением искусственной локальной гипотермии в те же временные промежутки. Также

отмечаются достоверные статистические различия в распространенности липоматоза межуточной ткани поджелудочной железы. В группе без применения холодового воздействия и моделированием панкреонекроза на 24 ($p=0,03$) жировое перерождение ткани носит локальный характер, достоверно меняясь к 48 ($p=0,03$) часам на гистологическую картину, описываемую как тотальный липоматоз, в отличие от группы где сразу после введения аутожелчи использовалась местная гипотермия. Существует ярко выраженные различия в таком показателе состояния интерстиция, как распространённость внутритканевых кровоизлияний. Так на 12 ($p=0,03$) часах преобладают диапедезные кровоизлияния, достоверно меняясь на картину обширных кровоизлияний к 48 часам ($p=0,03$) в группе без применения искусственной локальной гипотермии и моделированием панкреонекроза, в отличие от группы где сразу после введения аутожелчи применялась искусственная локальная гипотермия.

Таблица 5 Оценка состояние межуточной ткани поджелудочной железы в группах эксперимента

Состояние межуточной ткани	Панкреонекроз			Панкреонекроз +гипотермия			p		
	Сроки опыта (в часах)			Сроки опыта (в часах)			Сроки опыта (в часах)		
	12 (n=6)	24 (n=6)	48 (n=6)	12 (n=6)	24 (n=6)	48 (n=6)	12	24	48
Наличие и характер отека									
без изменений	0	0	0	0	0	0	1,0	1,0	1,0
локальный	0	0	0	6	5	1	0,001	0,007	0,05
разлитой	4	5	2	0	1	5	0,03	0,04	0,12
тотальный	2	1	4	0	0	0	0,22	0,5	0,03
Очаги липоматоза									
без изменений	0	0	0	6	4	3	0,001	0,03	0,09
единичные	3	0	0	0	2	3	0,09	0,22	0,09
локальный	3	4	1	0	0	0	0,09	0,03	0,5
диффузный	0	2	5	0	0	0	1,0	0,22	0,007
Воспалительная инфильтрация									
без изменений	0	0	0	1	1	0	0,5	0,5	1,0
единичная	0	0	0	5	4	5	0,007	0,03	0,007
очаговая	5	3	2	0	1	1	0,007	0,3	0,59
диффузная	1	3	4	0	0	0	0,5	0,09	0,03
Кровоизлияния									
без изменений	0	0	0	5	3	4	0,007	0,09	0,03
диапедезные	3	1	0	1	3	2	0,3	0,3	0,22
очаговые	3	3	2	0	0	0	0,09	0,09	0,22
обширные	0	2	4	0	0	0	1,0	0,22	0,03
Примечание: p- точный критерий Фишера; $p>1,0$ – при равном количестве наблюдений в сравниваемых группах									

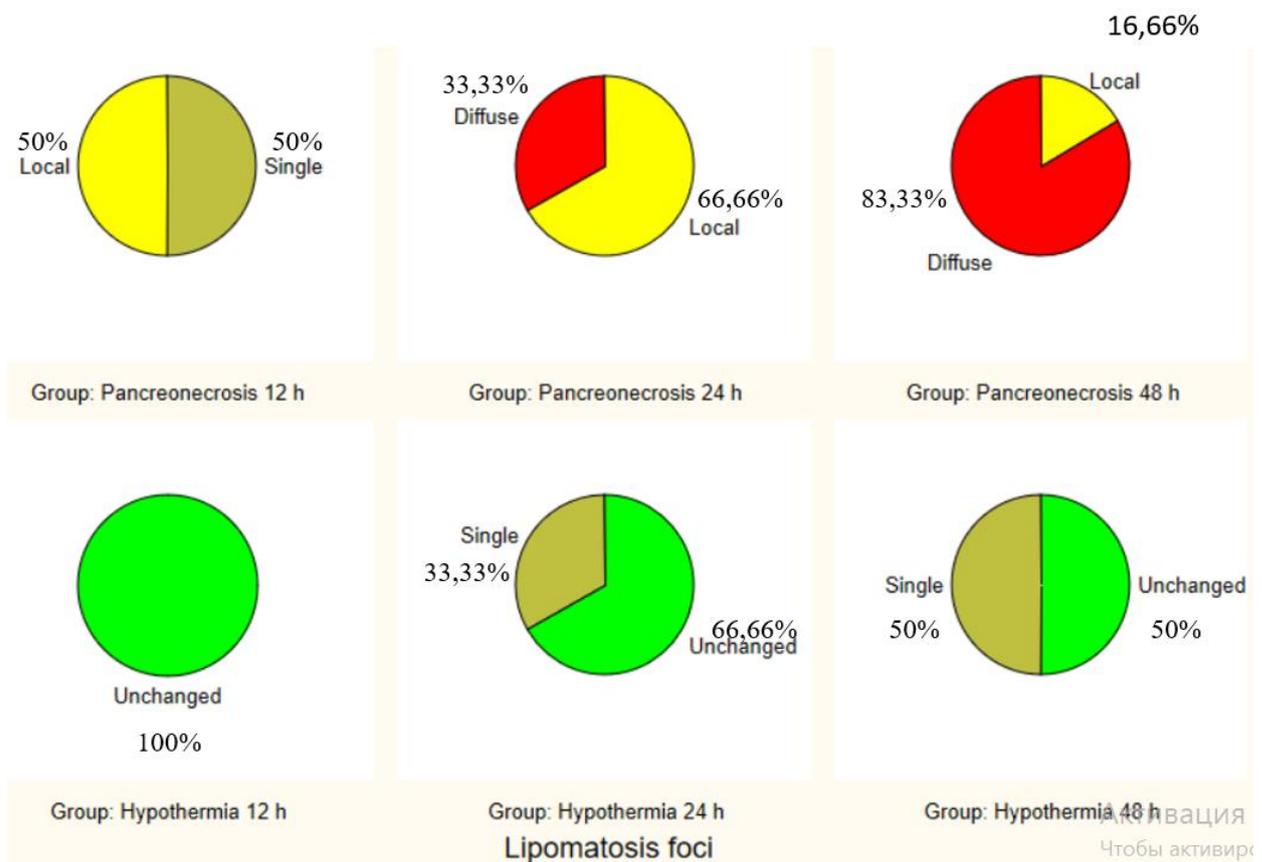


Рисунок 29. Сравнительная характеристика распространенности липоматоза в группах панкреонекроз и панкреонекроз+гипотермия на 12, 24 и 48 часах от начала эксперимента

Рисунок 29 отражает картину распространенности липоматоза межлосочной ткани в двух исследуемых группах по часам. На 12 часах от введения аутожелчи без наложения холодого воздействия в половине случаев отмечаются единичные очаги липоматоза, в другой половине случаев отмечены локальные очаги жирового перерождения интерстиция. В группе, где применялась ИЛГ сразу после введения аутожелчи в этом же временном промежутке межлосочная ткань остаётся сохранной от процесса липоматоза во всех исследуемых случаях. При этом на 48 часах от введения аутожелчи под влиянием местной гипотермии в 50% случаев отмечаются лишь единичные очаги жирового перерождения соединительной ткани, в 50% случаев ткань остается интактной в этом отношении. Напротив, в группах без холодого воздействия на 48 часах от введения аутожелчи наблюдается картина тотального липоматоза 83,33%, в 16% случаев процесс носит локальный характер.

Таким образом, по результатам статистического анализа состояния гистологической структуры тканей поджелудочной железы в двух группах исследования показали, что применение искусственной локальной гипотермии

сразу после введения аутожелчи в паренхиму железы приводит к абортированию некроза и сохранности структуры ткани органа.

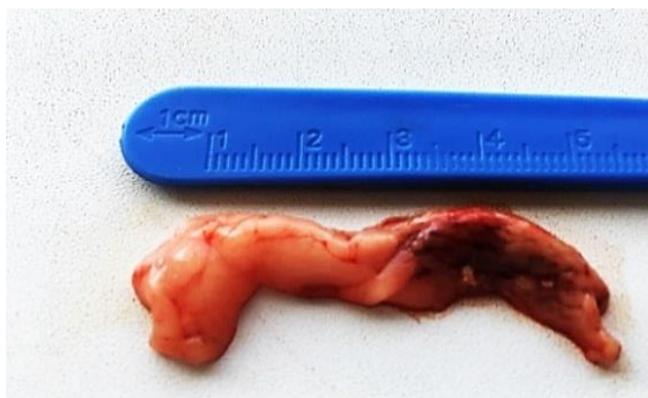
3.5 Сравнительная макроскопическая характеристика поджелудочной железы при моделировании панкреонекроза с наложением искусственной локальной гипотермии

С целью оценки влияния искусственной локальной гипотермии (ИЛГ) на динамику патоморфологических процессов на макроскопическом уровне нами было произведено измерение ряда параметров. Для определения выраженности отека органа проведено измерение окружности и продольного размера поджелудочной железы, для оценки выраженности воспалительных процессов осуществлено измерение количество выпота в брюшную полость.

Сравнительная оценка проводилась в двух группах исследования: первой – группе с панкреонекрозом, второй – группе с воспроизведением панкреонекроза и использованием ИЛГ. Измерения проводились на 12, 24, 48 часах в обеих группах.

Для оценки достоверности различий по трем исследуемым параметрам – окружность, продольный размер и количество выпота был использован непараметрический критерий для 2-х независимых групп, критерий Манна-Уитни.

Результаты исследования показали, что в срок через 12 часов опыта в обеих группах отсутствовал выпот в брюшной полости. При этом макроскопически отмечен отек ткани, полнокровие капсулы, очаги кровоизлияний при моделировании панкреонекроза без гипотермии, в группе при моделировании панкреонекроза с искусственной локальной гипотермией полнокровие сосудов и очагов кровоизлияний не выявлено (рисунок 30).



а



б



В



Г

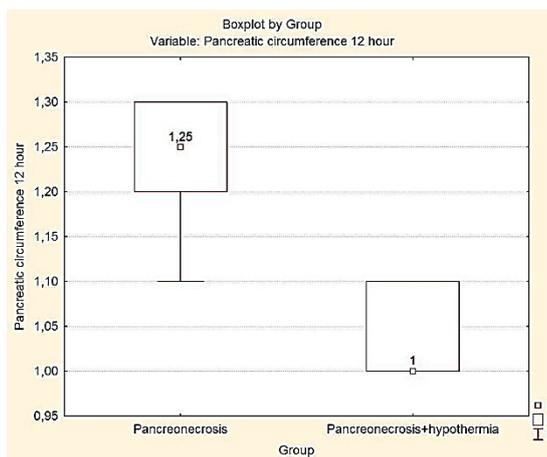
Рисунок 30. Макроскопическая картина поджелудочной железы на 12 часах в двух группах – с панкреонекрозом (а, в) и панкреонекрозом с использованием ИЛГ (б, г)

Проведенный анализ данных показал достоверность различий окружности ($p=0,0064$) и продольного размера железы ($p=0,0031$) на сроке 12 часов между двумя группами (таблица 6).

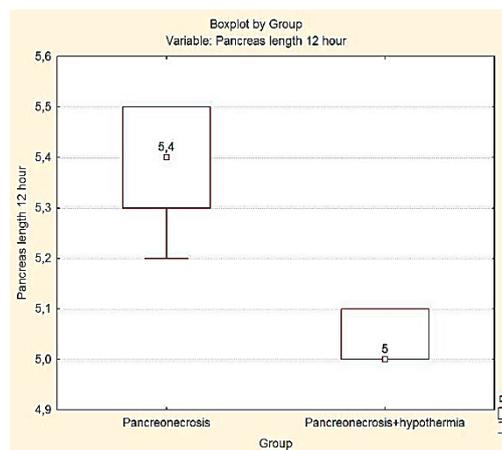
Таблица 6 – Размеры поджелудочной железы и количество выпота в брюшную полость через 12 часов

Группа	Без гипотермии	С гипотермией	Z	P-level
Срок опыта	12 часов <i>Me (Q25;Q75)</i>	12 часов <i>Me (Q25;Q75)</i>		
Окружность железы (см)	1,25 (1,1;1,3)	1,0 (1,0; 1,1)	2,722	0,0064
Продольный размер железы (см)	5,4 (5,3;5,5)	5,0 (5,0; 5,1)	2,882	0,0031
Количество выпота (мл)	-	-		

Таким образом, через 12 часов в группе с моделированием панкреонекроза отмечено некоторое нарастание отека за счет увеличения окружности и продольного размера поджелудочной железы, в сравнении с тем же временным промежутком в группе с моделированием панкреонекроза и применением ИЛГ (рисунок 31).



а



б

Рисунок 31. Окружность железы (а) и продольный размер (б) в группах панкреонекроз и панкреонекроз+ИЛГ на 12 часах

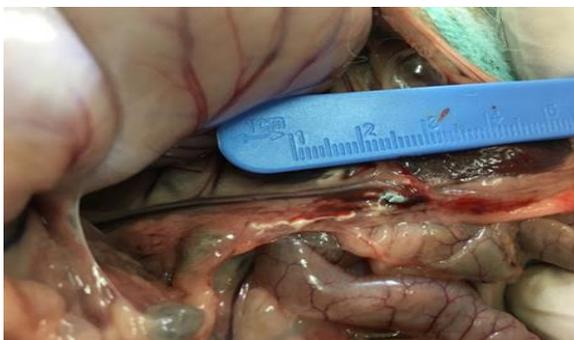
В сроке 24 часа эксперимента в двух экспериментальных группах отмечено появление выпота в брюшную полость. Но характер экссудата различен, так в группе с моделированием панкреонекроза выпот серозно-геморрагический, в группе же с применением ИЛГ серозный. Макроскопически отмечен отек ткани, полнокровие капсулы, паренхима железы имбибирована кровью, отмечается геморрагическое пропитывание при моделировании панкреонекроза без гипотермии, в отличие от группы с моделированием панкреонекроза с ИЛГ, где макроскопически отмечено только некоторое полнокровие капсулы (рисунок 32).



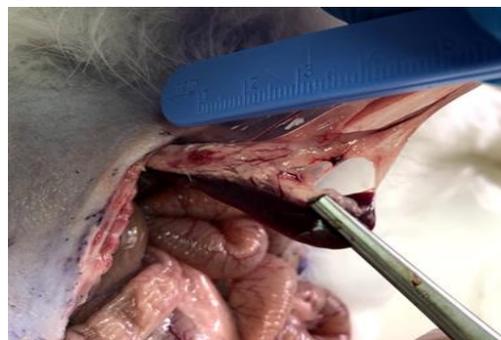
а



б



в



г

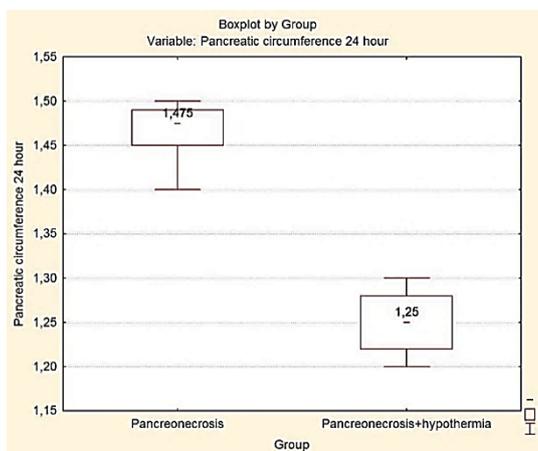
Рисунок 32. Макроскопическая картина поджелудочной железы на 24 часах в двух группах – с панкреонекрозом (а, в) и панкреонекрозом с использованием ИЛГ (б, г)

Статистический анализ подтверждает достоверность различий окружности ($p=0,0039$), продольного размера железы ($p=0,0039$) и количества выпота в брюшную полость ($p=0,0038$) в группе с моделированием панкреонекроза без гипотермии с группой моделирования панкреонекроза с использованием ИЛГ через 1 сутки (таблица 7).

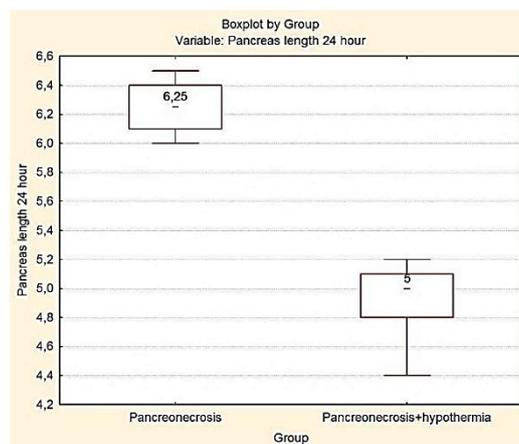
Таблица 7 – Размеры поджелудочной железы и количество выпота в брюшную полость через 24 часа

Группа	Без гипотермии	С гипотермией	Z	P-level
Срок опыта	24 часа Me (Q25;Q75)	24 часа Me (Q25;Q75)		
Окружность железы (см)	1,475 (1,4;1,5)	1,25 (1,2; 1,3)	2,882	0,0039
Продольный размер железы (см)	6,25 (6,0; 6,5)	5,0 (4,4; 5,2)	2,883	0,0039
Количество выпота (мл)	5,65 (5,0;6,0)	0,75 (0,3; 1,0)	2,883	0,0038

Размеры железы через 24 часа в группе с моделированием панкреонекроза без гипотермии также остаются больше по сравнению с группой моделирования панкреонекроза с ИЛГ, что показывает наличие большего отека железы при моделировании панкреонекроза без гипотермии (рисунок 33).



а



б

Рисунок 33. Окружность железы (а) и продольный размер (б) в группах панкреонекроз и панкреонекроз+ИЛГ на 24 часах

Следует отметить, что количество выпота в брюшной полости через 24 часа после моделирования панкреонекроза в 7,3 раза больше, чем при моделировании панкреонекроза с применением ИЛГ (рис. 34).

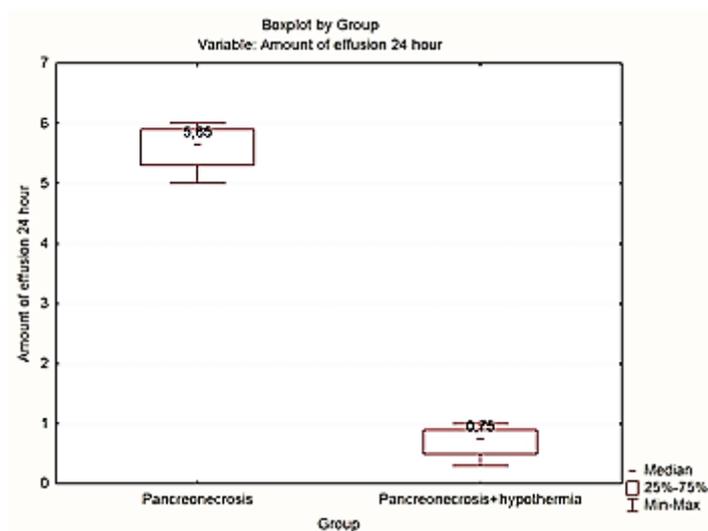


Рисунок 34. Количество выпота в группах панкреонекроза и панкреонекроз+ИЛГ на 24 часах

В сроке 48 часов эксперимента макроскопически отмечено сморщивание ткани, консистенция органа значительно уплотнена, паренхима железы имbibирована кровью, отмечены участки жирового некроза, распространяющегося на близлежащие ткани при моделировании панкреонекроза без гипотермии. При этом отмечено только резкое полнокровие капсулы при моделировании панкреонекроза с использованием ИЛГ на этом же временном промежутке. В группе без применения гипотермии характер экссудата в брюшной полости геморрагический и серозный - с ее применением (рисунок 35).



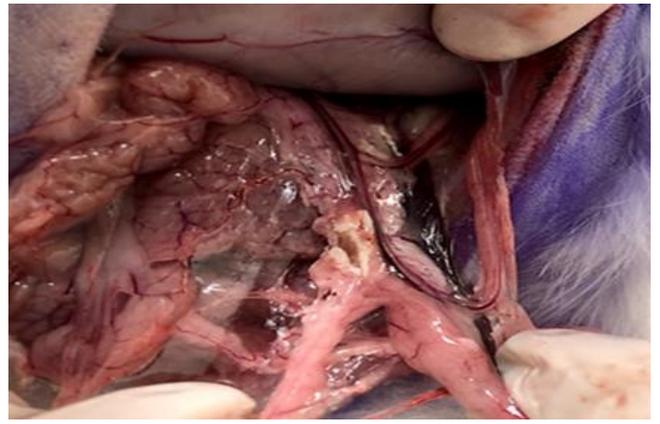
а



б



б



г

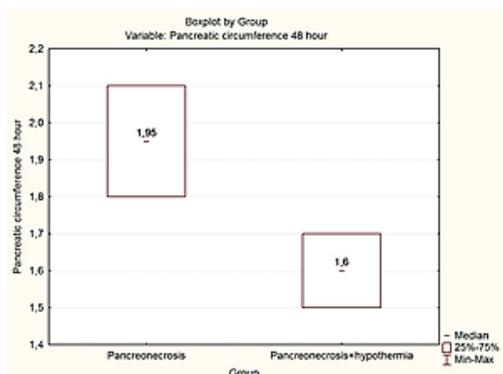
Рисунок 35 – Макроскопическая картина поджелудочной железы на 48 часах в двух группах – с панкреонекрозом (а, б) и панкреонекрозом с использованием ИЛГ (в, г)

Анализ данных показывает достоверные различия по окружности ($p=0,0036$) и продольному размеру железы ($p=0,0039$), а также по количеству выпота в брюшную полость ($p=0,0039$) между группами с моделированием панкреонекроза без гипотермии и группой с моделированием панкреонекроза с ИЛГ (таблица 8).

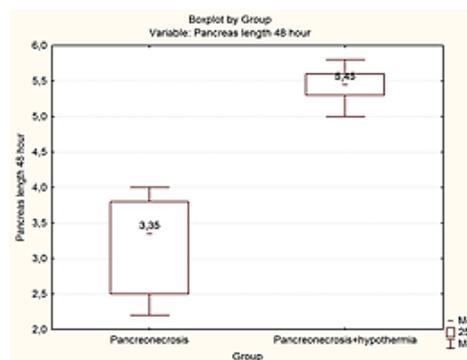
Таблица 8 – Размеры поджелудочной железы и количество выпота в брюшную полость через 48 часов

Группа	Без гипотермии	С гипотермией	Z	P-level
Срок опыта	48 часов <i>Me (Q25; Q75)</i>	48 часов <i>Me (Q25; Q75)</i>		
Окружность железы (см)	1,475 (1,4; 1,5)	1,25 (1,2; 1,3)	2,883	0,0036
Продольный размер железы (см)	3,35 (2,15; 4,0)	5,45 (5,0; 5,7)	-2,882	0,0039
Количество выпота (мл)	8,55 (8,0; 9,0)	2,65 (2,0; 3,0)	2,882	0,0039

Через 48 часов после моделирования панкреонекроза без гипотермии отмечено сморщивание органа (продольный размер железы в 1,6 раза меньше), в отличие от моделирования панкреонекроза с ИЛГ в эти же сроки эксперимента (рисунок 3б).



а



б

Рисунок 36 – Окружность железы (а) и продольный размер (б) в группах панкреонекроз и панкреонекроз+ИЛГ на 48 часах

Исследования показали, что количество выпота в брюшную полость через 48 часов после моделирования панкреонекроза без гипотермии в 3,2 раза больше, чем при моделировании панкреонекроза с применением ИЛГ (рисунок 37).

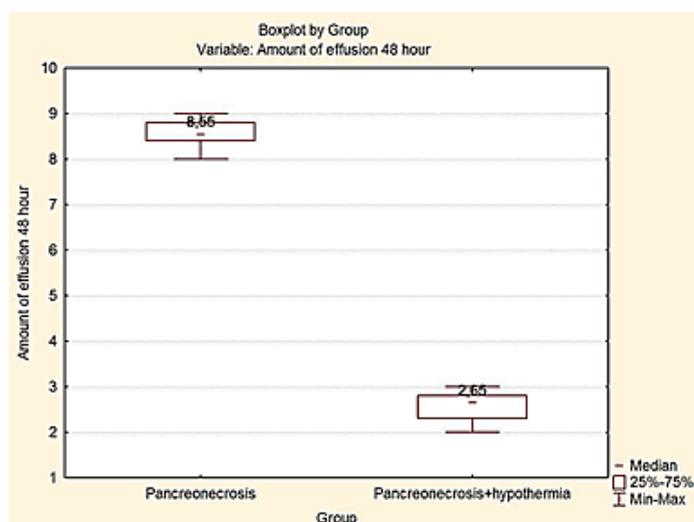


Рисунок 37. Количество выпота в группах панкреонекроз и панкреонекроз+ИЛГ на 48 часах

Таким образом, проведенный сравнительный анализ размеров поджелудочной железы и количества выпота в брюшную полость показали, что в результате воздействия искусственной локальной гипотермии на ткань поджелудочной железы при моделировании панкреонекроза отмечено значительное снижение интенсивности и скорости развития некробиотических процессов на макроскопическом уровне.

3.6 Сравнительная характеристика концентрации амилазы и липазы при моделировании панкреонекроза и наложении искусственной локальной гипотермии

В таблице 9 приведены средние значения концентрации амилазы и липазы в сыворотке крови экспериментальных животных в группах с моделированием панкреонекроза и с моделированием панкреонекроза и наложением искусственной локальной гипотермии, а также в группе с проведением так называемой SHAM-операции, где проводилось только вскрытие брюшной полости. Данные приведены во всех трех исследуемых временных промежутках для каждой группы соответственно.

Для оценки статистической достоверности различий между группами попарно был использован статистический критерий Манна-Уитни.

Данные таблицы 9 свидетельствуют о достоверных различиях, возникающих в концентрациях амилазы под воздействием гипотермии, примененной интраоперационно непосредственно сразу после введения аутожелчи в паренхиму поджелудочной железы и без ее применения в сроке 12 ($p=0,03$) и 48 ($p=0,005$) часах.

Во временном промежутке 24 часа статистически достоверных отличий в концентрациях амилазы в группах с моделированием панкреонекроза и моделированием панкреонекроза с наложением местного холодового воздействия не обнаружено ($p=0,22$). При статистическом анализе различий средних концентрации амилазы в группе с холодовым воздействием и SHAM-операцией во всех трех временных промежутках обнаружены статистически значимые различия: 12 ($p=0,005$), 24 ($p=0,005$) и 48 ($p=0,005$) часов.

Следует отметить, что во временном промежутке 48 часов среднее значение концентрации амилазы сыворотки крови экспериментальных животных в группе с моделированием панкреонекроза без применения местной гипотермии снижается до $154,5 \pm 22,7$ U/l. Именно падение уровня амилазы сыворотки крови является критерием тяжелого панкреонекроза. В группе же с холодовым воздействием, приложенным сразу после введения аутожелчи в паренхиму железы средняя концентрация амилазы остается достаточно высокой, сохраняясь на уровне $401,7 \pm 107,6$ U/l, что указывает на цитолитический синдром без выраженного некротического компонента. Из чего можно сделать предварительное заключение в связи с вышеописанной микроскопической картиной безъядерного некротического поля на 48 часах от начала эксперимента в группе с моделированием панкреонекроза и сохранностью жизнеспособных клеток под влиянием холодового воздействия, не смотря на введение аутожелчи в паренхиму железы в аналогичный временной промежуток о том, что холодовое воздействие сохраняет тканевой потенциал и жизнеспособность клеток.

Таблица 9 – Средние значения концентрации амилазы и липазы крови в группах панкреонекроз, гипотермия и SHAM

Показатель	Время	Панкреонекроз	Гипотермия	SHAM
Амилаза	12 ч	285±79,7*	220,7±36,3*,**	141±28**
	24 ч	583,3±269,8	390±131,8**	125±20**
	48 ч	154,5±22,7*	401,7±107,6*,**	122,8±44,6**
Липаза	12 ч	312±120,8*	216,7±41,2*,**	162,5±25,1**
	24 ч	905,3±279,3*	382±161,2*,**	153,5±17,7**
	48 ч	159,5±41,9*	558,2±175,6*,**	146±29,7**

Примечание: * - уровень значимости <0,05 между группами панкреонекроз и гипотермия, ** - уровень значимости <0,05 между группами гипотермия и SHAM

Аналогическая динамика изменения активности фермента в зависимости от наличия холодового воздействия отмечена для липазы сыворотки крови. Данные таблицы 9 свидетельствуют о достоверных различиях в концентрации липазы сыворотки крови между группами с моделированием панкреонекроза и моделированием панкреонекроза с наложением искусственной локальной гипотермии во всех трех временных промежутках – 12 ($p=0,03$), 24 ($p=0,005$) и 48 ($p=0,005$) часов. Также на 12 ($p=0,005$), 24 ($p=0,008$) и 48 ($p=0,005$) часах отмечены статистически достоверные отличия в концентрации липазы сыворотки крови экспериментальных животных между группами с холодовым воздействием и SHAM-операцией.

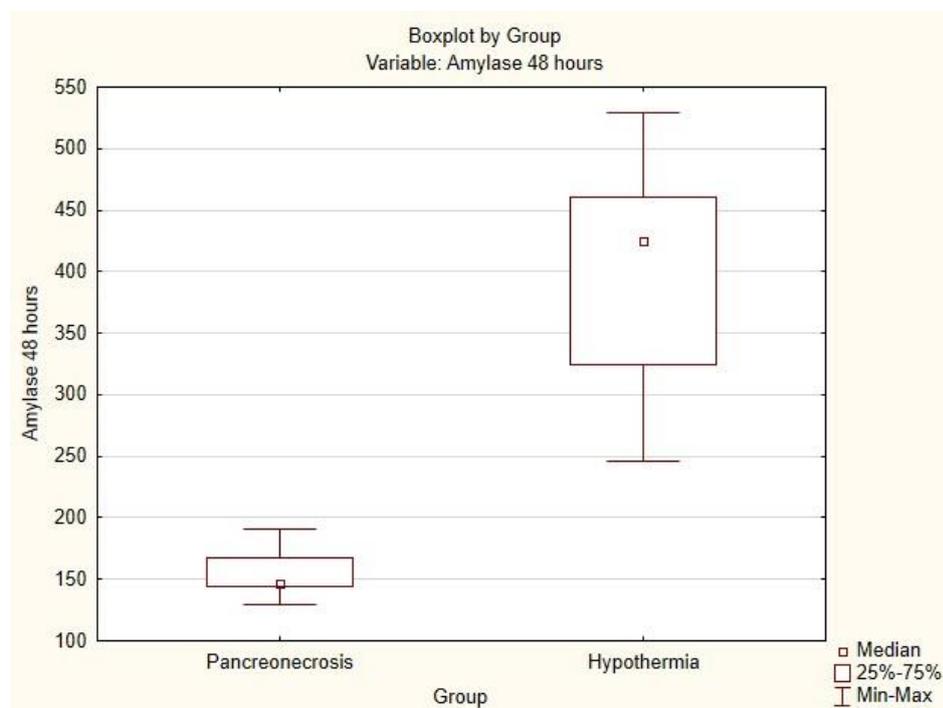


Рисунок 38 – Сравнительная оценка концентрации амилазы в группах панкреонекроз и гипотермия на 48 часах от начала эксперимента

Рисунок 38 наглядно демонстрирует, как на 48 часах от начала эксперимента под воздействием искусственной локальной гипотермии концентрация амилазы сыворотки остается достаточно высокой $401,7 \pm 107,6$ U/l, но без применения холода средняя концентрация амилазы снижается в 2,6 раза, достигая $154,5 \pm 22,7$ U/l.

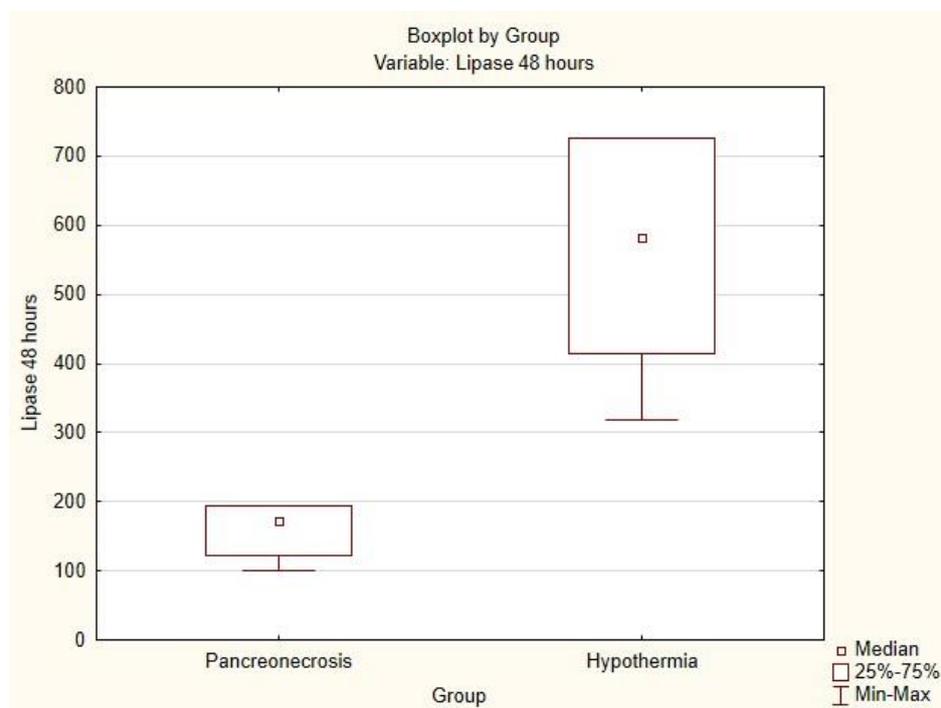


Рисунок 39 – Сравнительная оценка концентрации липазы в группах панкреонекроз и гипотермия на 48 часах от начала эксперимента

Рисунок 39 демонстрирует схожую тенденцию, описанную выше для фермента амилазы. Так на 48 часах от начала эксперимента под воздействием искусственной локальной гипотермии концентрация липазы сыворотки остается достаточно высокой $558,2 \pm 175,6$ U/l, но без применения холода средняя концентрация амилазы снижается почти в 3,4 раза, достигая $159,5 \pm 41,9$ U/l.

Таким образом можно заключить, что искусственная локальная гипотермия на фоне сохраняющихся цитолитических процессов, приводит к абортированию процессов некроза, несмотря на введение аутожелчи в паренхиму поджелудочной железы.

3.7 Сравнительная характеристика концентрации внеклеточных нуклеиновых кислот плазмы и эритроцитов при моделировании панкреонекроза и наложении искусственной локальной гипотермии

С целью оценки сохранения регенераторного потенциала клеток поджелудочной железы был проведен анализ содержания внеклеточных нуклеиновых кислот, кислоторастворимых фракции белков (гистоны) и метаболитов пуринового обмена. Известно, что уровень ДНК в плазме крови

отражает степень и глубину некроза клеток. С другой стороны, метаболиты пуринового обмена могут служить маркерами наличия сохранного потенциал клеток к репарации.

В таблице 10 приведены средние значения концентрации внеклеточных нуклеиновых кислот в эритроцитах и плазме в экспериментальных группах с моделированием панкреонекроза (панкреонекроз), с моделированием панкреонекроза и наложением интраоперационно искусственной локальной гипотермии (гипотермия) и группой со вскрытием брюшной полости с дальнейшим ее ушиванием (SHAM)

Согласно данным таблицы 10 концентрация КРФ в эритроцитах в группе экспериментальных животных с панкреонекрозом имеет тенденцию незначительного роста на 24 и 48 часах, но при межгрупповом сравнении остаётся значительно ниже в соответствующих временных промежутках по отношению к двум другим группам. В группе SHAM наблюдается константность показателей на наиболее высоком уровне по отношению к группам панкреонекроз и гипотермия. Концентрация КРФ в эритроцитах при гипотермии имеет уникальный характер, имея средний показатель близкий к нулю на первом временном отрезке (12 часов), возрастает, приближаясь к показателям группы SHAM на 24 часах и остается достаточно высокой на 48 часах от начала эксперимента.

В плазме крови средняя концентрация КРФ при панкреонекрозе на 12 часах имеет высокий изначальный уровень и снижается практически на 40% на 24 часах, незначительно возрастая на 48 часах от начала эксперимента. В группе SHAM тенденция плато в первых двух временных промежутках (12 и 24 часа), сменяется на увеличение более чем в 2,5 раза на 48 часах от начала эксперимента. Причем при межгрупповом сравнении средние показатели концентрации SHAM-группы значительно ниже таковых в двух других экспериментальных группах на 12 и 24 часах, и превышают показатели в группах с панкреонекрозом и гипотермией на 48 часах от начала эксперимента. Тенденция изменения концентрации КРФ в плазме при гипотермии незначительно отличается от таковой при панкреонекрозе на всех трех временных промежутках от начала эксперимента.

Таблица 10 – Средние значения концентрации внеклеточных нуклеиновых кислот в эритроцитах и плазме крови в группах панкреонекроз, гипотермия и SHAM

Показатель	Время	Панкреонекроз		Гипотермия		SHAM	
		Эритроциты	Плазма	Эритроциты	Плазма	Эритроциты	Плазма
КРФ	12 ч	0,01167 ±0,0105	0,064846 ±0,006	0,00291 ±0,002**	0,064689 ±0,006**	0,07856 ±0,001**	0,019277 ±0,001**
	24 ч	0,02362 ±0,015*	0,039374 ±0,015	0,06328 ±0,011*	0,034574 ±0,010**	0,07856 ±0,007	0,019317 ±0,003
	48 ч	0,02899 ±0,024	0,048104 ±0,018	0,049174 ±0,024**	0,040731 ±0,022	0,081529 ±0,007**	0,055629 ±0,004

РНК	12 ч	0,005183 ±0,002	0,00473 ±0,002	0,005899 ±0,003	0,004626 ±0,002**	0,008778 ±0,0007	0,001739 ±0,0002**
	24 ч	0,00575 1±0,004*	0,004725 ±0,005	0,012549 ±0,005*	0,002547 ±0,001	0,008778 ±0,0007	0,001872 ±0,0005
	48 ч	0,0047 ±0,002*	0,00561 ±0,002	0,012255 ±0,004*	0,001937 ±0,0004**	0,028759 ±0,008	0,006403 ±0,0004**
ДНК	12 ч	0,008111 ±0,004	0,002439 ±0,0004	0,008509 ±0,002**	0,002331 ±0,0005	0,010548 ±0,004**	0,002428 ±0,0005
	24 ч	0,014312 ±0,009	0,002717 ±0,0007*	0,005299 ±0,005**	0,001489 ±0,0009*,**	0,010548 ±0,003**	0,002588 ±0,0005**
	48 ч	0,036603 ±0,030*	0,002717 ±0,003*	0,00521 ±0,006*	0,001247 ±0,001*	0,003443 ±0,0004	0,003443 ±0,0001
Примечание: * - уровень значимости <0,05 между группами панкреонекроз и гипотермия, ** - уровень значимости <0,05 между группами гипотермия и SHAM							

Также на основании данных таблицы 10 можно сделать выводы о том, что при панкреонекрозе тенденция изменения концентрации вкРНК в эритроцитах на первых двух временных отрезках от начала эксперимента (12 и 24 часа) находится на одном уровне и незначительно снижается на последнем временном промежутке (48 часов). При межгрупповом сравнении на всех трех временных промежутках средняя концентрация вкРНК при панкреонекрозе значительно ниже чем в группах SHAM и гипотермия. Средняя концентрация вкРНК в эритроцитах в SHAM-группе на двух первых временных отрезках (12 и 24 часа) остается без изменений, но на 48 часах от начал эксперимента возрастает более чем в 3 раза. Концентрации вкРНК в эритроцитах в группе гипотермии на временном отрезке в 24 часа возрастают более чем в 2 раза по сравнению с 12 часами, и остаются на этом же уровне и на 48 часах от начала эксперимента.

Тенденция изменения концентраций вкРНК в плазме для всех трех исследуемых групп (панкреонекроз, SHAM и гипотермия) в зависимости от времени и в межгрупповом аспекте можно охарактеризовать как не имеющие особенностей в связи с малыми изменениями средних значений на всех трех временных промежутках (12, 24 и 48 часов).

При оценке тенденции изменения концентрации вкДНК в эритроцитах в группе панкреонекроз отмечается увеличение более чем в 1,5 раза на 24 часах по сравнению с 12 часами, и далее резкое увеличение более чем в 2,5 раза на 48 часах по сравнению с 24 часами от начала эксперимента. При межгрупповом сравнении отмечается повышение концентрации вкДНК в эритроцитах в 7 раз на 48 часах по сравнению с группами SHAM и гипотермия в этом же временном промежутке. В SHAM-группе средняя концентрация вкДНК на 12 и 24 часах остается неизменной, снижаясь в 3 раза к 48 часам от начала эксперимента. В группе с гипотермией тенденция изменения концентрации вкДНК схожа с SHAM-группой, снижение показателей в 1,5 раза происходит к 24 часам и остается неизменным и к 48 часам от начала эксперимента.

Тенденция изменения концентрации вкДНК в плазме не имеет особенностей для всех трех групп (панкреонекроз, SHAM и гипотермия) на 3 временных отрезках – 12, 24 и 48 часов от начала эксперимента.

3.7.1 Сравнительная характеристика концентрации внеклеточных нуклеиновых кислот в эритроцитах и плазме крови в группах панкреонекроз, гипотермия и SHAM попарно

Для сравнительной оценки концентрации внеклеточных нуклеиновых кислот в исследуемых группах панкреонекроз и гипотермия был использован непараметрический критерий Манна-Уитни для двух независимых групп.

Полученные данные расчета погрупповых различий концентрации КРФ продемонстрированы в таблице 11.

Таблица 11 – Сравнительная оценка концентрации КРФ в эритроцитах и плазме крови в группах панкреонекроз, гипотермия и SHAM

Время	Группы сравнения(попарно)							
	КРФ							
	Панкреонекроз/гипотермия				Гипотермия/SHAM			
	Эритроциты		Плазма		Эритроциты		Плазма	
	Z	p	Z	p	Z	p	Z	p
12 часов	1,441153	0,149542	0,880705	0,378478	2,802243	0,005075*	-2,80224	0,005075*
24 часа	-2,80224	0,005075*	0,240192	0,810181	1,521217	0,128206	-2,80224	0,005075*
48 часов	-1,04083	0,297954	0,720577	0,471171	2,161730	0,030640*	1,841474	0,065553
Примечание: Z - значение непараметрического критерия Манна-Уитни, p* - уровень значимости <0,05								

При межгрупповом сравнении данных концентрации КРФ в эритроцитах и плазме крови в группе с моделированием панкреонекроза и с наложением локальной гипотермии статистически значимых отличий не выявлено ($p \geq 0,05$), кроме временного промежутка на 24 часах от начала эксперимента, где в эритроцитах отмечается достоверное различие в концентрации КРФ ($p=0,005$) (рисунок 40).

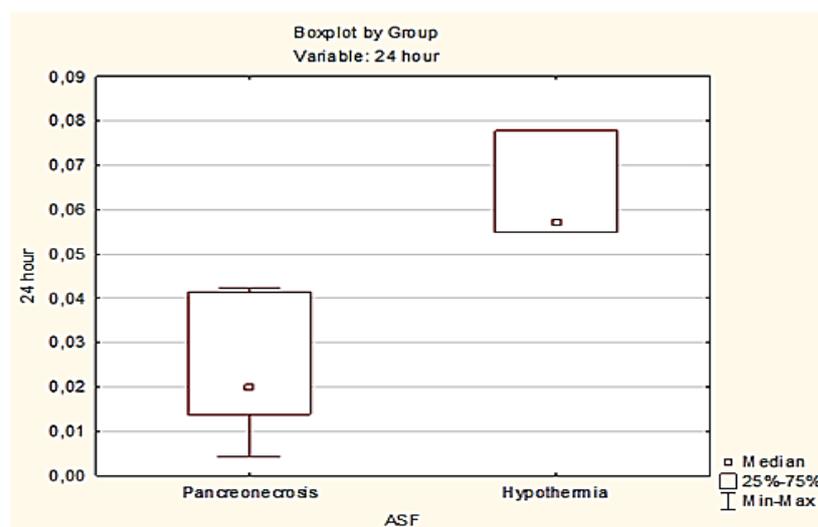


Рисунок 40 – Сравнительная оценка концентрации КРФ в эритроцитах в группах панкреонекроз и гипотермия на 24 часах от начала эксперимента

На рисунке 41 представлены данные о статистически значимых различиях в концентрации КРФ в эритроцитах между группами с наложением локальной гипотермии после инъекции аутожелчи и группой SHAM в промежутках 12 часов ($p=0,005$) и 48 часов ($p=0,030$).

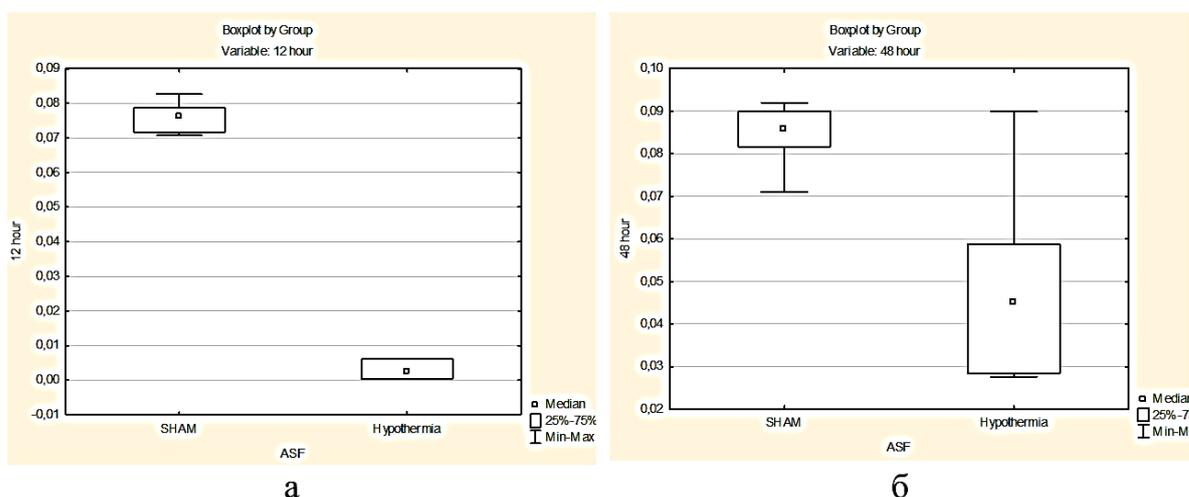


Рисунок 41 – Результаты сравнительной оценки концентрации КРФ в эритроцитах в группах SHAM и гипотермия на 12(а) и 48 часах(б) от начала эксперимента

Рисунок 42 демонстрирует наличие достоверных различий в концентрациях КРФ в плазме крови на 12 часах ($p=0,0050$) и 24 часах ($p=0,005$) между группами гипотермия и SHAM.

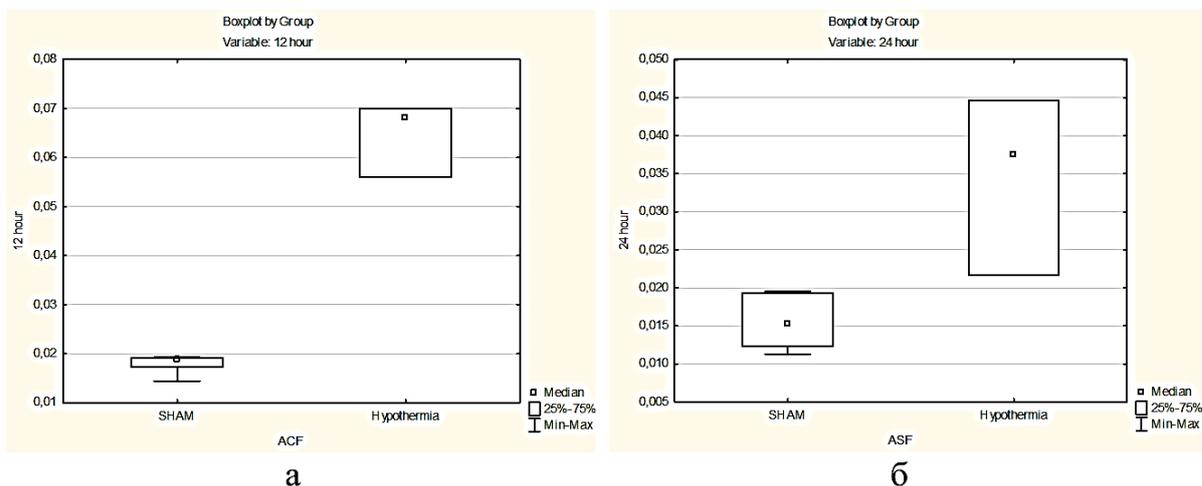


Рисунок 42– Результаты сравнительной оценки концентрации КРФ в плазме крови в группах SHAM и гипотермия на 12(а) и 24 часах(б) от начала эксперимента

В таблице 12 приведены данные расчёта межгрупповых различий концентрации вкРНК и вкДНК в эритроцитах и плазме попарно между группами с моделированием панкреонекроза и моделированием панкреонекроза с наложением локальной гипотермии, а также гипотермией и SHAM.

Таблица 12 – Сравнительная оценка концентрации вкРНК и вкДНК в эритроцитах и плазме крови в группах панкреонекроз, гипотермия и SHAM

Время	Группы сравнения(попарно)							
	вкРНК							
	Панкреонекроз/гипотермия				Гипотермия/SHAM			
	Эритроциты		Плазма		Эритроциты		Плазма	
	Z	p	Z	p	Z	p	Z	p
12 часов	0,400320	0,688921	0,880705	0,378478	0,880705	0,378478	-2,80224	0,005075*
24 часа	-2,16173	0,030640*	0,880705	0,378478	0,880705	0,378478	0,560449	0,575174
48 часов	-2,48199	0,013066*	1,841474	0,065553	2,802243	0,005075*	2,802243	0,005075*
вкДНК								
12 часов	0,480384	0,630954	0,880705	0,378478	2,161730	0,030640*	0,720577	0,471171
24 часа	1,841474	0,065553	2,161730	0,030640*	2,161730	0,030640*	2,161730	0,030640*
48 часов	2,481986	0,013066*	2,161730	0,030640*	0,560449	0,575174	0,880705	0,378478

Примечание: Z - значение непараметрического критерия Манна-Уитни, p* - уровень значимости <0,05

На рисунке 43 продемонстрированы данные о различии концентрации вкРНК в эритроцитах на 24 часах ($p=0,030$) и 48 часах ($p=0,013$) между группами с моделированием панкреонекроза и наложением искусственной локальной гипотермии.

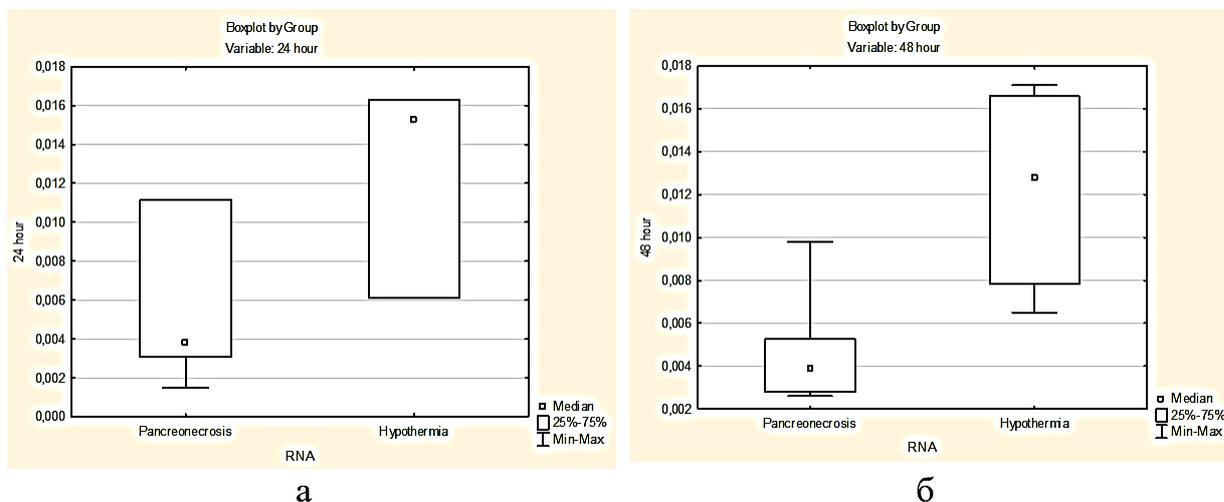


Рисунок 43 – Результаты сравнительной оценки концентрации вкРНК в эритроцитах в группах панкреонекроз и гипотермия на 24(а) и 48 часах(б) от начала эксперимента

Также отмечается достоверные отличия в концентрации вкРНК в эритроцитах на 48 часах ($p=0,005$) от начала эксперимента в группах с наложением локальной гипотермии и SHAM (рисунок 44).

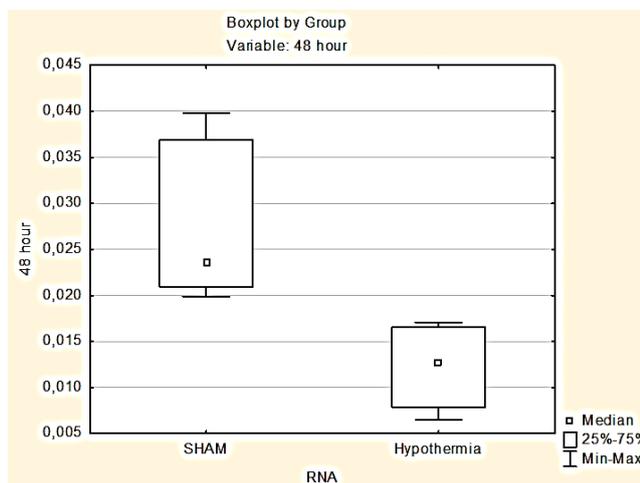
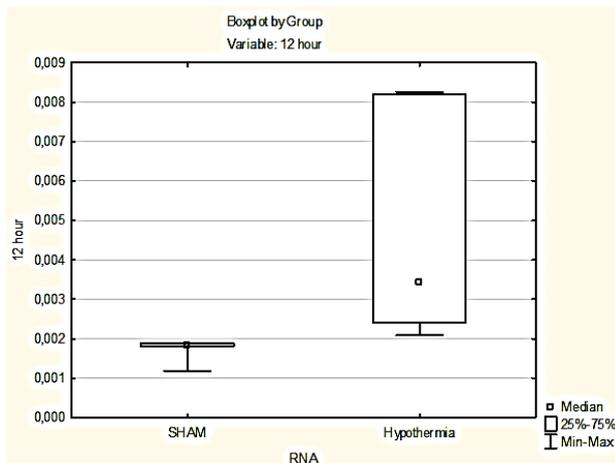
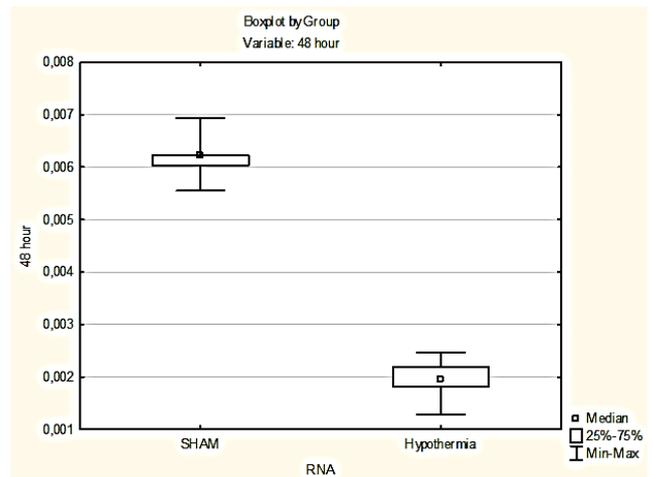


Рисунок 44 – Результаты сравнительной оценки концентрации вкРНК в эритроцитах в группах SHAM и гипотермия на 48 часах от начала эксперимента

На рисунке 45 продемонстрировано наличие достоверных отличий в концентрации вкРНК в плазме крови на 12 часах ($p=0,005$) и 48 часах ($p=0,005$) в группах SHAM и гипотермия.



а



б

Рисунок 45 – Результаты сравнительной оценки концентрации вкРНК в плазме крови в группах гипотермия SHAM на 12 (а) и 48 часах (б) от начала эксперимента

Рисунок 46 демонстрирует достоверные отличия в концентрации вкДНК в эритроцитах на 48 часах от начала эксперимента в группах с моделированием панкреонекроза и наложением искусственной локальной гипотермии ($p=0,013$).

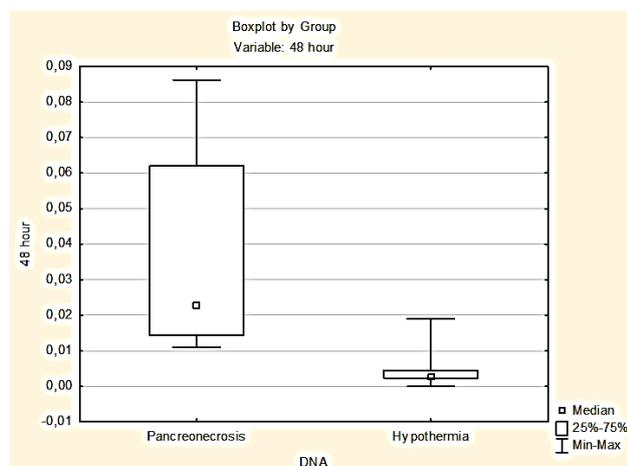


Рисунок 46 – Результаты сравнительной оценки концентрации вкДНК в эритроцитах в группах панкреонекроз и гипотермия на 48 часах от начала эксперимента

Также отмечают достоверные отличия в концентрации вкДНК в плазме крови на 24 часах ($p=0,030$) и 48 часах ($p=0,030$) в группах панкреонекроз и гипотермия (рисунок 47).

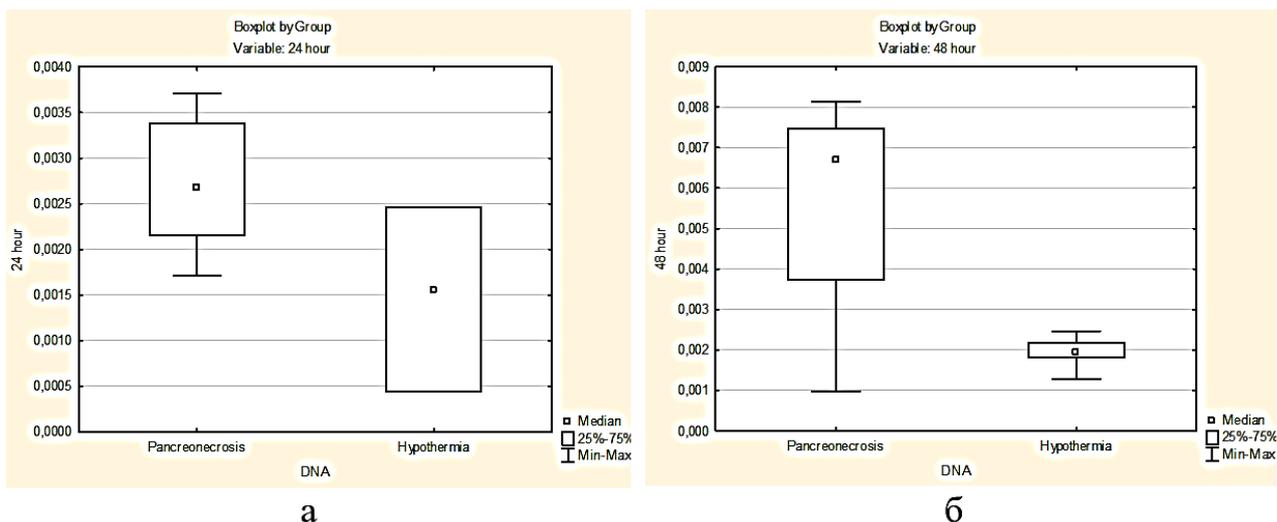


Рисунок 47 – Результаты сравнительной оценки концентрации вкДНК в плазме крови в группах панкреонекроз и гипотермия на 24(а) и 48 часах(б) от начала эксперимента

На рисунке 48 показано наличие достоверных отличий в концентрации вкДНК в эритроцитах на 12 часах ($p=0,030$) и 24 часах ($p=0,030$) от начала эксперимента в группах с наложением локальной гипотермии и SHAM.

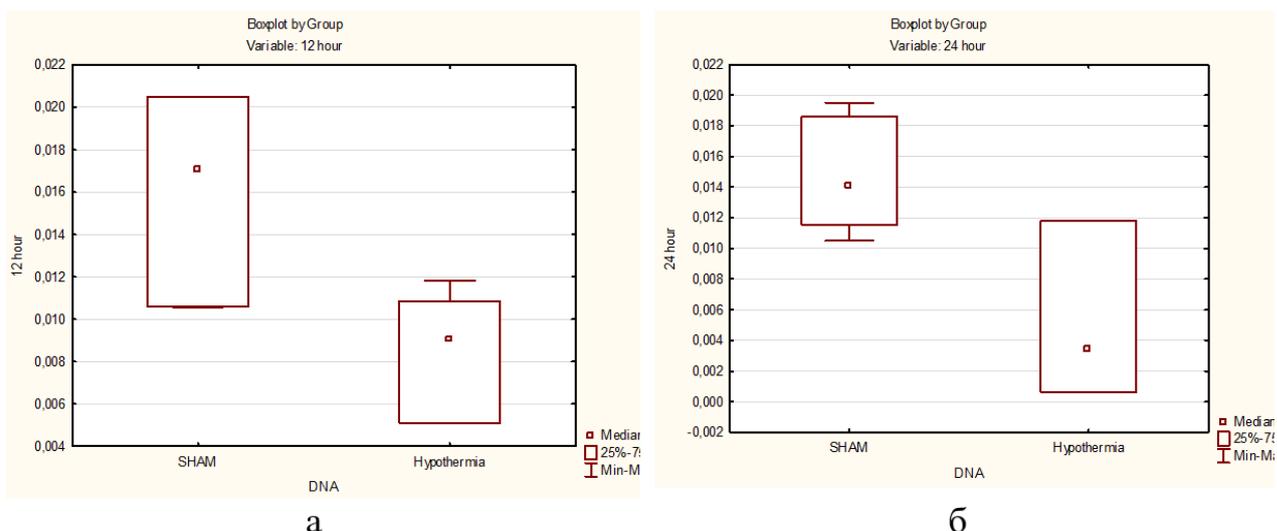


Рисунок 48 – Результаты сравнительной оценки концентрации вкДНК в эритроцитах в группах гипотермия и SHAM на 12(а) и 24 часах(б) от начала эксперимента

На рисунке 49 продемонстрировано наличие достоверных отличий в концентрации вкДНК в плазме крови на 24 часах ($p=0,030$) от начала эксперимента в группах с наложением локальной гипотермии и SHAM.

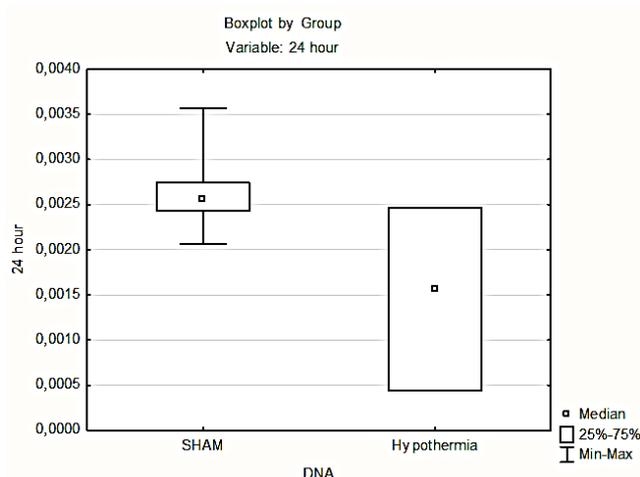


Рисунок 49 – Результаты сравнительной оценки концентрации вкДНК в плазме крови в группах гипотермия и SHAM на 24 часах(б) от начала эксперимента

Таким образом, при наложении искусственной локальной гипотермии отмечено отсутствие повышение уровня внеклеточных ДНК. Под влиянием местного холодого воздействия внеклеточные РНК продолжают повышаться в сроках 12, 24 и 48 часов, но намного ниже чем без применения гипотермии. КРФ не меняются под действием гипотермии. Низкий уровень внеклеточных ДНК в плазме крови говорит о сохранении регенераторного потенциала поджелудочной железы под влиянием гипотермии, отсутствие изменений КРФ говорит о соизмеримом повреждающем воздействии на орган, производимом инъекцией аутожелчи.

3.8 Сравнительная характеристика концентрации пуринов плазмы крови и эритроцитов при моделировании панкреонекроза и с наложением искусственной локальной гипотермии

В таблице 13 приведены средние значения концентрации пуринов в эритроцитах и плазме в экспериментальных группах с моделированием панкреонекроза (панкреонекроз), с моделированием панкреонекроза и наложением интраоперационно искусственной локальной гипотермии (гипотермия) и группой со вскрытием брюшной полости с дальнейшим ее ушиванием (SHAM).

В SHAM-группе отмечается относительная стабильность всех показателей пуринового метаболизма и в эритроцитах, и плазме крови на всех временных промежутках от начала эксперимента (12, 24 и 48 часах).

При оценке тенденции изменения концентрации метаболитов пуринового обмена (аденина, гуанина, гипоксантина и ксантина) в эритроцитах в группе панкреонекроз наблюдается однонаправленная динамика: повышенный уровень на 12 часах (в 1,7 раза SHAM), резкое снижение к 24 часам – в 1,3 раза, и вторичное повышение к 48 часам – в 1,2 раза по сравнению с показателем SHAM-группы. Уровень мочевой кислоты в эритроцитах повышается с 12 часов до 48 часов, причем на 48 часах этот показатель на: выше, чем в SHAM-

группе. Это отражает известный факт, что мочевая кислота является продуктом глубокого катаболизма нуклеиновых кислот.

Уровень аденина и ксантина в плазме крови в группе панкреонекроз от 12 часов до 48 часов имеет незначительную тенденцию к снижению в 1,2 раза, а уровень гуанина и гипоксантина практически не изменяется на всех трех сроках наблюдения. Уровень мочевой кислоты в плазме крови прогрессивно снижается от 12 до 48 часов эксперимента.

Динамика изменения концентрации всех метаболитов пуринового обмена в эритроцитах и плазме крови в группе панкреонекроз и с наложением гипотермии имеет однотипный характер: незначительно повышенный уровень (в 1,2 раза) с 12 часов снижается в 2,2 раза к 48 часов эксперимента. Такую тенденцию можно объяснить снижением скорости метаболических реакций как ответ на гипотермию.

Таблица 13 – Средние значения концентрации пуринов в эритроцитах и плазме крови в группах панкреонекроз, гипотермия и SHAM

Показатель	Время	Панкреонекроз		Гипотермия		SHAM	
		Эритроциты	Плазма	Эритроциты	Плазма	Эритроциты	Плазма
Аденин	12 ч	1678 ±430,1	179 ±38,8	1698 ±440**	187 ±32,2**	1004 ±77,8**	93±9,3**
	24 ч	849 ±516,8	189 ±88,8	944 ±651,6	110 ±22,7	1116 ±212,8	129 ±25,5
	48 ч	1257 ±761,7	149 ±44	795 ±337	107 ±35	1031 ±303	131 ±20,8
Гуанин	12 ч	1532 ±354,4	252 ±43,3	1498 ±355,9**	221 ±34,6	888 ±74**	200 ±24,8
	24 ч	697 ±425,7	254 ±99,2	738 ±453	173 ±32,1**	935 ±46,7	228 ±19,1**
	48 ч	1196 ±790	240 ±67,4*	593 ±239,4	160 ±50,3*	784 ±60,1	143 ±22,3
Гипоксантин	12 ч	1750 ±469	252 ±41,5	1648 ±521,7**	221 ±39,2**	999 ±46,9**	200 ±23,9**
	24 ч	793 ±480,8	254 ±96,8	855 ±551,5	173 ±30,1	1002 ±26,2	228 ±16,8
	48 ч	1246 ±770,4	240 ±56,6	699 ±287,1	160 ±41,6	870 ±13,1	143 ±37,4
Ксантин	12 ч	482 ±124,6	131 ±19,5	487 ±113,9	150 ±22**	426 ±57,2	84 ±8,1**
	24 ч	304 ±151,7	109 ±98	352 ±218,7	87 ±18,9	466 ±69,5	86 ±5,7
	48 ч	500 ±377,1	96 ±21,6	329 ±136,3	79 ±27,3**	410 ±71,7	121 ±15,5**
Мочевая кислота	12 ч	88 ±25,3	82 ±18,4	82 ±24	97 ±10,2**	106 ±29,3	42 ±8,7**
	24 ч	58 ±29,6	71 ±58,6	62 ±23,3**	45 ±10,6	94 ±28,7**	55 ±15,1
	48 ч	143 ±198,8	46 ±15,4	66 ±23,2**	38 ±13,4**	110 ±28,1**	55 ±8,3**

Примечание: * - уровень значимости <0,05 между группами панкреонекроз и гипотермия, ** - уровень значимости <0,05 между группами гипотермия и SHAM

Тенденция изменения концентрации мочевой кислоты в эритроцитах в группе панкреонекроз можно описать, как уменьшение на 24 часах в 1,5 раза по сравнению с 12 часами и резкое увеличение на 48 часах 2,5 раза по сравнению с 24 часами от начала эксперимента (таблица 13). В SHAM-группе изменения на всех трех временных промежутках (12, 24 и 48 часах) незначительные. При межгрупповом сравнении уровень мочевой кислоты в группе SHAM выше во всех трех временных промежутках по сравнению с группами панкреонекроз и гипотермия, за исключением 48 часов в группе панкреонекроз, где среднее значение концентрации мочевой кислоты выше в 1,3 раза по сравнению с тем же временным промежутком группы SHAM. В группе гипотермия на 24 часах отмечается незначительное снижение в 1,3 раза по сравнению с 12 часами, далее на 48 часах показатель практически не меняется по сравнению с 24 часами от начала эксперимента.

В тенденции показателей средних значений концентрации мочевой кислоты в плазме крови в группе панкреонекроз на 24 часах отмечается незначительное снижение по сравнению с 12 часами от начала эксперимента. Далее на 48 часах происходит снижение показателей в 1,5 раза по сравнению с 24 часами. В группе SHAM на 24 часах происходит незначительное повышение показателей мочевой кислоты в 1,3 раза по сравнению с 12 часами, далее на 48 часах показатель практически не меняется по сравнению с 24 часами от начала эксперимента. В группе гипотермия на 24 часах происходит снижение концентрации мочевой кислоты в плазме крови более чем в 2,5 раза по сравнению с 12 часами, далее на 48 часах показатель практически не меняется по сравнению с 24 часами от начала эксперимента.

Для сравнительной оценки концентрации пуринов в исследуемых группах панкреонекроз и гипотермия был использован непараметрический критерий Манна-Уитни для двух независимых групп.

В таблице 14 приведены данные расчёта межгрупповых различий концентрации аденина и гуанина в эритроцитах и плазме попарно между группами с моделированием панкреонекроза и моделированием панкреонекроза с наложением локальной гипотермии, а также гипотермией и SHAM.

Таблица 14 – Сравнительная оценка концентрации аденина и гуанина в эритроцитах и плазме крови в группах панкреонекроз, гипотермия и SHAM

Время	Группы сравнения(попарно)							
	Аденин							
	Панкреонекроз/гипотермия				Гипотермия/SHAM			
	Эритроциты		Плазма		Эритроциты		Плазма	
	Z	p	Z	p	Z	p	Z	p
12 часов	-0,160128	0,872780	1,120897	0,262333	2,802243	0,005075*	2,802243	0,005075*
24 часа	0,00	1,000000	-0,880705	0,378478	-0,880705	0,378478	-1,84147	0,065553
48 часов	-0,560449	0,575174	-1,52122	0,128206	-1,76141	0,078170	-1,28103	0,200186
Гуанин								
12 часов	-1,04083	0,297954	-1,84147	0,065553	2,802243	0,005075*	0,960769	0,336669
24 часа	0,00	1,000000	-0,880705	0,378478	-0,880705	0,378478	-2,80224	0,005075*
48 часов	-0,880705	0,378478	-2,08167	0,037374*	-1,20096	0,229767	0,00	1,000000

Примечание: Z - значение непараметрического критерия Манна-Уитни, p* - уровень значимости <0,05

На рисунке 50 отображено наличие статистически значимых различий в концентрации аденина в эритроцитах ($p=0,005$) и плазме крови ($p=0,005$) на 12 часах от начала эксперимента между группами с наложением локальной гипотермии и SHAM.

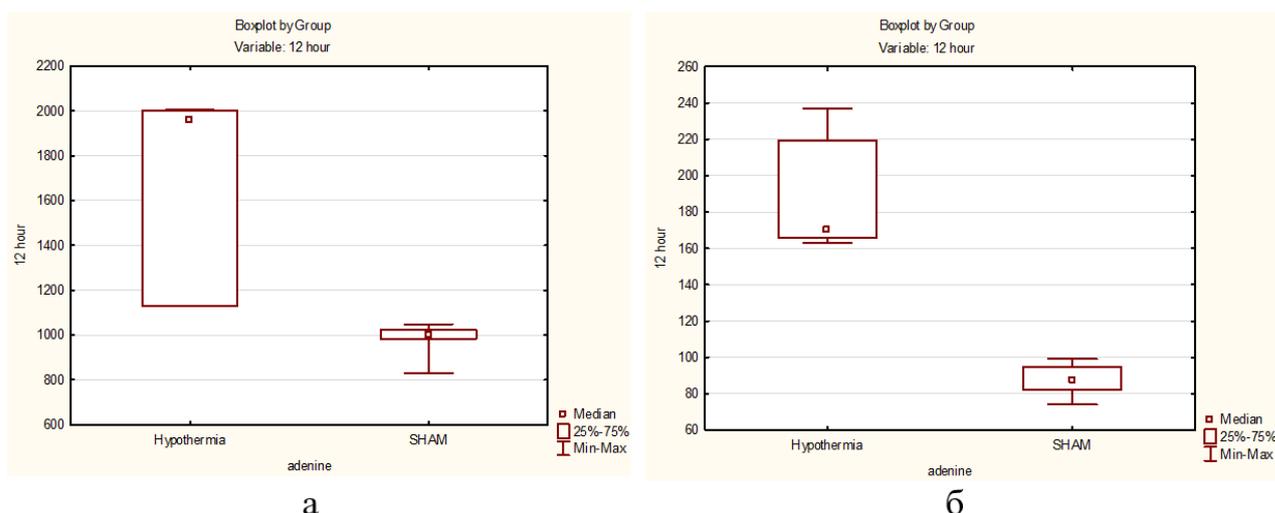


Рисунок 50 – Результаты сравнительной оценки концентрации аденина в эритроцитах(а) и плазме крови(б) в группах гипотермия и SHAM на 12 часах от начала эксперимента

Рисунок 51 отражает достоверные отличия в концентрации гуанина в плазме крови на 48 часах ($p=0,037$) от начала эксперимента в группах с моделированием панкреонекроза и наложением искусственной локальной гипотермии.

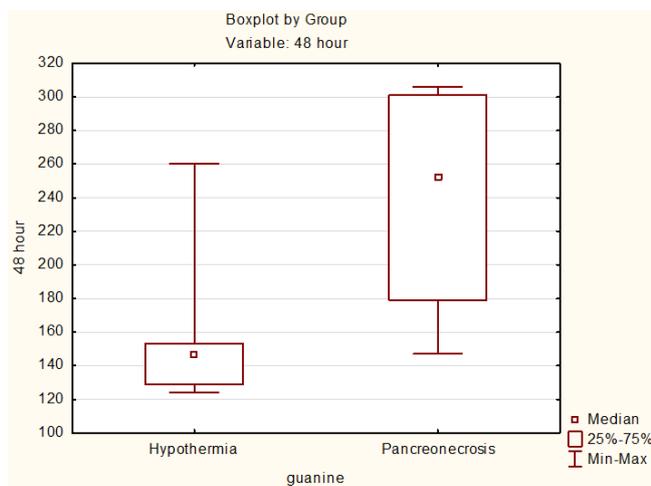


Рисунок 51 – Результаты сравнительной оценки концентрации гуанина в плазме крови в группах панкреонекроз и гипотермия на 48 часах от начала эксперимента

Также отмечаются статистически значимые отличия в концентрации гуанина в эритроцитах на 12 часах ($p=0,005$) и в плазме крови на 24 часах ($p=0,005$) от начала эксперимента между группами с наложением локальной гипотермии и SHAM (рисунок 52).

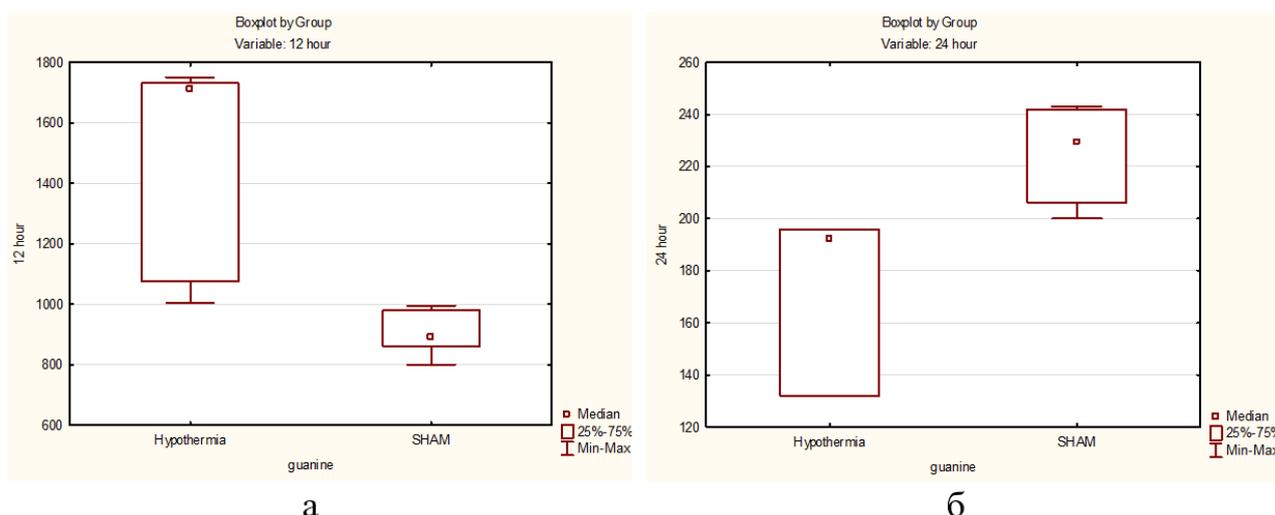


Рисунок 52 – Результаты сравнительной оценки концентрации гуанина в эритроцитах на 12 часах(а) и плазме крови на 24 часах (б) от начала эксперимента в группах гипотермия и SHAM

В таблице 15 представлены данные расчёта межгрупповых различий концентрации аденина и гуанина в эритроцитах и плазме попарно между

группами с моделированием панкреонероза и моделированием панкреонероза с наложением локальной гипотермии, а также гипотермией и SHAM.

Таблица 15 – Сравнительная оценка концентрации гипоксантина, ксантина и мочевой кислоты в эритроцитах и плазме крови в группах панкреонекроз, гипотермия и SHAM

Время	Группы сравнения(попарно)							
	Гипоксантин							
	Панкреонекроз/гипотермия				Гипотермия/SHAM			
	Эритроциты		Плазма		Эритроциты		Плазма	
	Z	p	Z	p	Z	p	Z	p
12 часов	-0,240192	0,810181	-1,20096	0,229767	2,802243	0,005075*	2,802243	0,005075*
24 часа	0,00	1,000000	-0,880705	0,378478	-0,880705	0,378478	0,00	1,000000
48 часов	-1,04083	0,297954	-1,84147	0,065553	-0,880705	0,378478	-2,16173	0,030640*
Ксантин								
12 часов	0,00	1,000000	1,521217	0,128206	0,720577	0,471171	2,802243	0,005075*
24 часа	0,240192	0,810181	0,00	1,000000	-0,880705	0,378478	-0,560449	0,575174
48 часов	-0,560449	0,575174	-0,960769	0,336669	-1,36109	0,173486	-2,48199	0,013066*
Мочевая кислота								
12 часов	-0,560449	0,575174	1,521217	0,128206	-1,84147	0,065553	2,802243	0,005075*
24 часа	0,240192	0,810181	0,00	1,000000	-2,00160	0,045328*	-0,880705	0,378478
48 часов	0,00	1,000000	-0,560449	0,575174	-2,24179	0,024975*	-2,40192	0,016310*
Примечание: Z - значение непараметрического критерия Манна-Уитни, p* - уровень значимости <0,05								

Рисунок 53 отображает статистически значимые различия в концентрации гипоксантина в эритроцитах на 12 часах($p=0,005$) от начала эксперимента в группах гипотермия и SHAM.

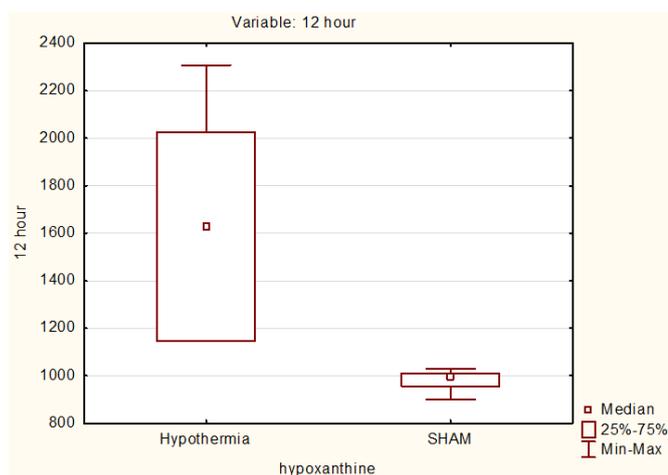
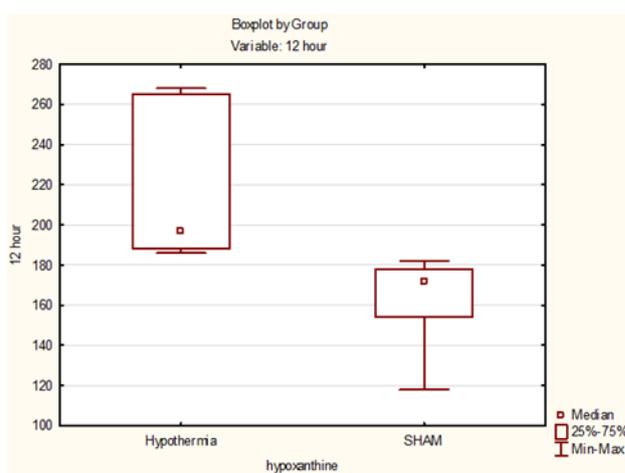
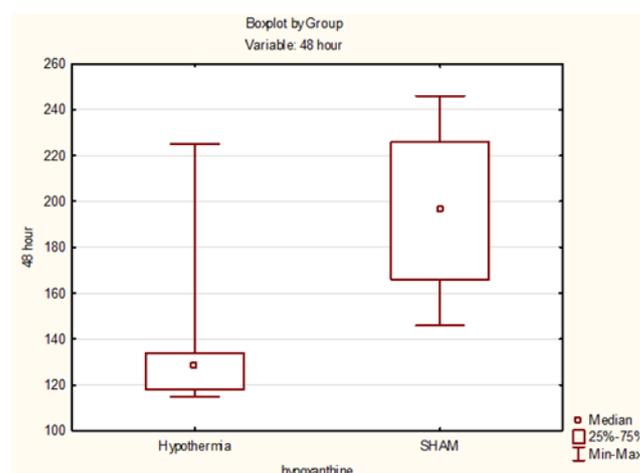


Рисунок 53 – Результаты сравнительной оценки концентрации гипоксантина в эритроцитах на 12 часах от начала эксперимента в группах гипотермия и SHAM

На рисунке 54 представлены статистически данные о статистически значимых отличиях концентрации гипоксантина в плазме крови на 12 часах ($p=0,005$) и 48 часах ($p=0,030$) от начала эксперимента в группах гипотермия и SHAM.



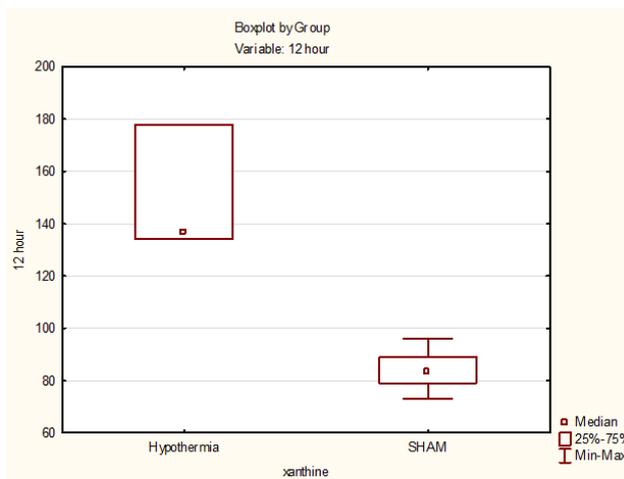
а



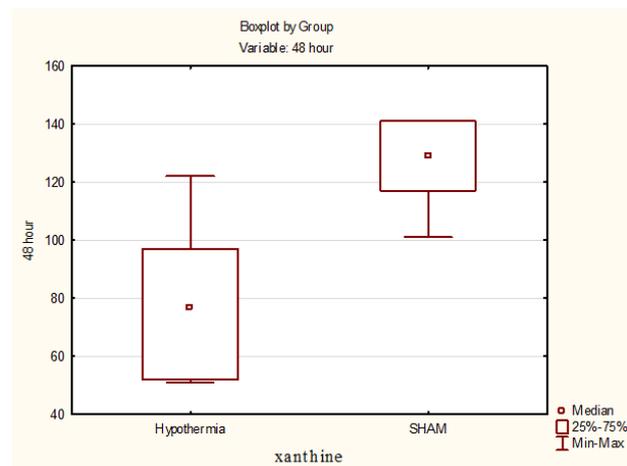
б

Рисунок 54 – Результаты сравнительной оценки концентрации гипоксантина в плазме крови на 12 часах(а) и 48 часах от начала эксперимента в группах гипотермия и SHAM

Также отмечается наличие статистически значимых различий в концентрации ксантина в плазме крови в группах гипотермия и SHAM на 12 часах ($p=0,050$) и 48 часах ($p=0,013$) от начала эксперимента (рисунок 55).



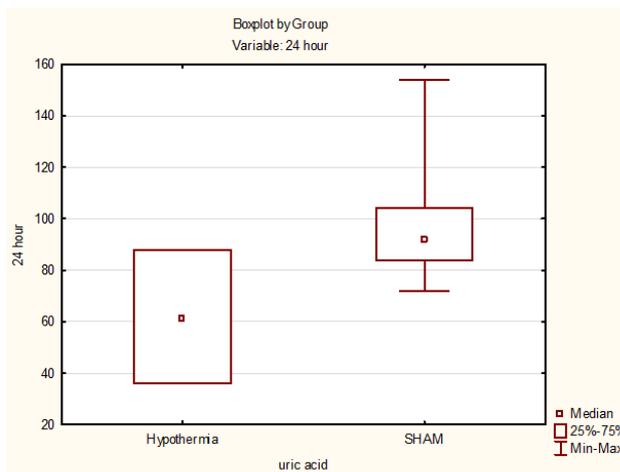
а



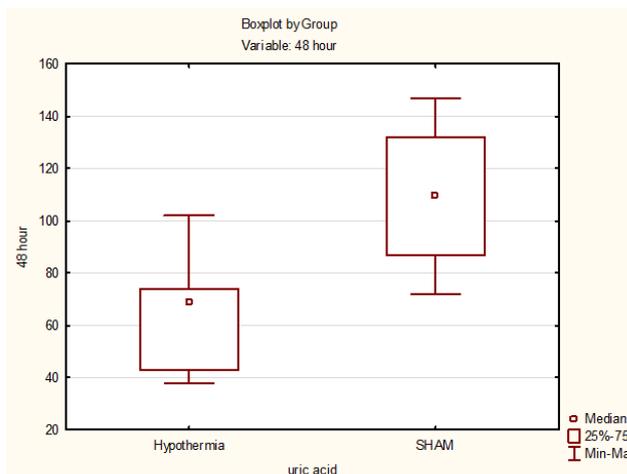
б

Рисунок 55 – Результаты сравнительной оценки концентрации ксантина в плазме крови в группах гипотермия и SHAM на 12(а) и 48 часах(б) от начала эксперимента

На рисунок 56 отмечаются статистически значимые различия в концентрации мочевой кислоты в эритроцитах в группах с наложением искусственной локальной гипотермии и SHAM на 24 часах($p=0,045$) и 48 часах($p=0,024$) от начала эксперимента.



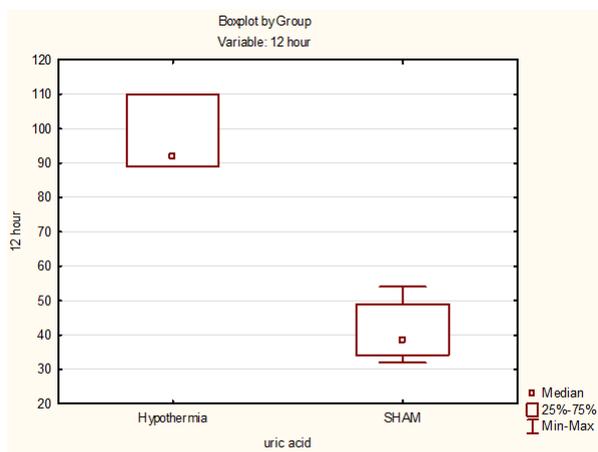
а



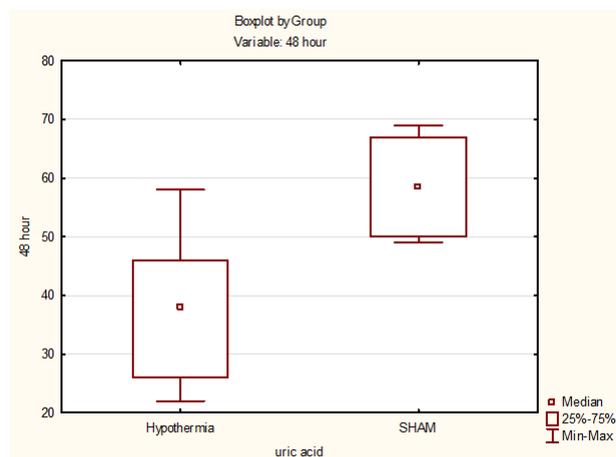
б

Рисунок 56 – Результаты сравнительной оценки концентрации мочевой кислоты в эритроцитах в группах гипотермия и SHAM на 24 часах(а) и 48 часах(б) от начала эксперимента

Рисунок 57 демонстрирует статистически значимые различия в концентрации мочевой кислоты в плазме на 12 часах ($p=0,0055$) и 48 часах ($p=0,016$) от начала эксперимента в группах с наложением искусственной локальной гипотермии и SHAM.



а



б

Рисунок 57 – Результаты сравнительной оценки концентрации мочевой кислоты в плазме крови в группах гипотермия и SHAM на 12 часах(а) и 48 часах(б) от начала эксперимента

Таким образом показатели пуринового метаболизма крови в группе с моделированием панкреонекроза и наложением искусственной локальной гипотермией в динамике эксперимента прогрессивно снижаются от 12 часов к 48 часам по сравнению с таковыми в группе с моделированием панкреонекроза без применения холода, что свидетельствует о выраженном замедлении метаболизма как реакции на гипотермию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на внедрение в клиническую практику высокоспециализированных методов лечения при остром панкреатите, по статистике в 25% случаев развивается некротический панкреатит. При этом смертность при неинфицированных формах панкреонекроза составляет около 41%, а при инфицированных формах достигает 53%, что указывает на нерешенность данной проблемы и необходимость поиска новых методов лечения [132]. Основной целью данного исследования являлась оценка влияния искусственной локальной гипотермии на течение экспериментального панкреонекроза.

Результаты исследования показали, что новая предлагаемая методика малоинвазивная, легко воспроизводится модель некротического панкреатита путем введения аутожелчи животного в паренхиму поджелудочной железы. Данная модель выгодно отличается от других, наиболее часто используемых в научной практике, так как ее воспроизведение не требует вскрытия просвета тонкого кишечника [133, 134]. Инъекция выполняется в двух бессосудистых анатомических областях железы животного, для чего используется минимальная доза желчи полученной в момент операции у самого животного, что само по себе более физиологично и легко контролируется визуально без применения дополнительной аппаратуры и грубых инвазивных воздействий.

Данное исследование позволило определить оптимальный и доступный источник холодового воздействия на поджелудочную железу экспериментального животного [135]. В стендовом эксперименте с применением 3 видов охлаждающих агентов было выяснено, что наибольшей длительностью охлаждения обладает аккумулятор холода (карбоксиметилцеллюлоза), имеющий продолжительную фазу температурного плато, которая оценивается как состояние гипотермии, температура остается на уровне $+26,5^{\circ}\text{C}$, эффект локального охлаждения продолжается более 15 минут. Наиболее низкие температуры охлаждения биологической ткани показал сухой лед (твёрдый диоксид углерода), охлаждавший биологическую ткань до $+20,0^{\circ}\text{C}$, но его эффект оказался непродолжительным около 8 минут, также, имеются неприемлемые изменения биологической ткани в виде ее локальной кристаллизации в месте наложения агента. Наиболее неудовлетворительные результаты отмечаются при наложении льда (H_2O в кристаллическом состоянии), градиент температуры по отношению к исходной составил всего 4°C , а экспозиция гипотермии составила не более 3 минут.

При проведении исследования разработана методика интраоперационного наложения искусственной локальной гипотермии: стерильный контейнер (презерватив) с заранее охлажденным до -17°C (температура бытовой морозильной камеры) агентом помещался в брюшную полость. Динамика охлаждения отслеживалась погруженным в брюшную полость электронным термометром. Методика проста и эффективна, разработана специально для наложения аккумулятора холода (карбоксиметилцеллюлоза), который ранее был определен в стендовом эксперименте. Процесс охлаждения во время

наложения легко динамически контролируется при помощи термометрии. Сама процедура охлаждения полностью атравматична и исключает инфицирование брюшной полости за счет использования стерильных контейнеров.

В исследованиях de Oliveira С. с соавторами в своем экспериментальном исследовании показали, что трансгастральная локальная гипотермия поджелудочной железы снижает тяжесть некроза поджелудочной железы, апоптоза, воспаления и маркеров панкреатита и увеличивает выживаемость [136]. Полученные нами данные основанные на морфологических исследованиях показали, что применение искусственной локальной гипотермии приводит к уменьшению выпота после 48 часов от введения аутожелчи с $8,55 \pm 0,45$ мл до $2,65 \pm 0,35$ мл ($p=0,0039$), регрессия отека железы с $1,47 \pm 0,33$ см до $1,25 \pm 0,55$ см ($p=0,0036$). Сморщивание ткани железы стало значительно менее выраженным, изменившись с $3,35 \pm 0,86$ см и до $5,45 \pm 0,31$ см ($p=0,0039$). В этом же временном промежутке на фоне гипотермии отсутствовали очаги воспаления ацинарной и жировой ткани. Проведенная морфометрическая оценка структурных изменений поджелудочной железы на моделях панкреонекроза в группах с введением аутожелчи и с проведением искусственной локальной гипотермии в разные сроки эксперимента наглядно иллюстрирует отличие в состоянии ядерной структуры в зависимости от наличия холодового воздействия на ткань поджелудочной железы. Так, на 48 часах после введения аутожелчи без применения холода отмечается преобладание кариолизиса (83,33%), то есть микроскопически определяется картина безъядерного поля с единичными остаточными ядерными структурами в состоянии кариорексиса (16,66%). В отличие от группы, в которой применялась ИЛГ, где в этом же временном промежутке отмечается в большинстве случаев сморщивание ядра (66,66%), в 33,33% случаев ядро осталось неизменным. Также при оценке объема некроза ацинусов ткани поджелудочной железы отмечается достоверные различия по критерию наличия тотального некроза на 48 ($p=0,007$) от начала эксперимента между группами с приложением искусственной локальной гипотермии и без такового. Таким образом результаты нашего исследования показали, что на применение искусственной локальной гипотермии ведет к abortивному течению панкреонекроза, в случае ее наложения сразу после введения аутожелчи в паренхиму поджелудочной железы экспериментального животного.

При межгрупповом сравнении данных концентрации КРФ в эритроцитах и плазме крови в группе с моделированием панкреонекроза и с наложением локальной гипотермии статистически значимых отличий не выявлено ($p \geq 0,05$), кроме временного промежутка на 24 часах от начала эксперимента, где в эритроцитах отмечается достоверное различие в концентрации КРФ ($p=0,005$). Отмечены достоверные отличия в концентрации вкДНК в эритроцитах на 48 часах от начала эксперимента в группах с моделированием панкреонекроза и наложением искусственной локальной гипотермии ($p=0,013$). Также выявлены статистически значимые различия в концентрации гуанина в плазме крови на

48 часах ($p=0,037$) от начала эксперимента в группах с моделированием панкреонекроза и наложением искусственной локальной гипотермии [137].

По итогам проведенного диссертационного исследования сделаны следующие **выводы**:

1) Предлагаемая экспериментальная модель панкреонекроза, воспроизводимая путем введения аутожелчи животного в паренхиму поджелудочной железы, позволяет изучить патогенез и морфологический субстрат процесса на разных его стадиях и является легко воспроизводимой.

2) Аккумулятор холода (карбоксиметилцеллюлоза) – является наиболее эффективным и доступным материалом для наложения искусственной локальной гипотермии без применения аппаратных средств. Имеет продолжительную фазу температурного плато оцениваемому как состояние гипотермии, температура остается на уровне $+26,5^{\circ}\text{C}$ большую часть времени, эффект локального охлаждения продолжается более 15 минут.

3) Методика интраоперационного наложения искусственной локальной гипотермии путем погружения охлаждающего агента в брюшную полость с динамической внутрибрюшной термометрией проста и эффективна, исключает инфицирование брюшной полости за счет использования стерильных контейнеров, а сама процедура охлаждения полностью атравматична.

4) Морфологические определено, что применение искусственной локальной гипотермии ведет к abortивному течению панкреонекроза, в случае ее наложения сразу после введения аутожелчи в паренхиму поджелудочной железы экспериментального животного. Отмечено уменьшению выпота после 48 часов от введения аутожелчи с $8,55\pm 0,45$ мл до $2,65\pm 0,35$ мл ($p=0,0039$), регрессии отека железы с $1,47\pm 0,33$ см до $1,25\pm 0,55$ см ($p=0,0036$). Сморщивание ткани железы становится значительно менее выраженным, меняясь с $3,35\pm 0,86$ см до $5,45\pm 0,31$ см ($p=0,0039$).

Выявлено влияние ИЛГ на сохранность гистологической структуры ткани как экзокринной части, так и эндокринного компонента: на 48 часах после введения аутожелчи без применения холода отмечается преобладание кариолизиса (83,33%) и тотальный некроз (83,33%), наложении ИЛГ отмечается сморщивание ядра (66,66%), в 33,33% случаев ядро осталось неизменным, в 50% случаев ткань остаётся сохранной и в 50% случаев отмечаются единичные очаги некроза ацинусов. при оценке объема некроза ацинусов ткани поджелудочной железы отмечается достоверные различия по критерию наличия тотального некроза на 48 ($p=0,007$) от начала эксперимента между группами с приложением искусственной локальной гипотермии и без такового.

5) Динамика изменения активности амилазы и липазы сыворотки крови экспериментальных животных в группе с моделированием панкреонекроза снижается до $154,5\pm 22,7$ U/l ($p=0,005$), при наложении ИЛГ - средняя концентрация амилазы остается достаточно высокой - $401,7\pm 107,6$ U/l ($p=0,005$), что указывает на цитолитический синдром без выраженного некротического компонента.

Динамика изменений уровня кислоторастворимой фракции белков в плазме и эритроцитах крови животных обеих экспериментальных групп однотипны между собой, что говорит о соизмеримом повреждающем воздействии на орган, производимом инъекцией аутожелчи. Уровень ДНК в эритроцитах крови животных на 48 часах в группе экспериментального панкреонекроза с наложением ИЛГ в 7 раз ниже по сравнению с группой с панкреонекрозом без наложения ИЛГ, что свидетельствует о сохранении регенераторной потенции клеток поджелудочной железы ($p=0,013$).

Динамика изменения концентрации всех метаболитов пуринового обмена в эритроцитах и плазме крови в группе панкреонекроз и с наложением гипотермии имеет однотипный характер: незначительно повышенный уровень (в 1,2 раза) с 12 часов снижается в 2,2 раза к 48 часов эксперимента, что свидетельствует о выраженном замедлении метаболизма как реакции на гипотермию.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанная модель панкреонекроза может быть использована для изучения различных патогенетических механизмов развития заболевания, а также его осложнений в эксперименте.

2. Результаты исследования позволяют рекомендовать аккумулятор холода (карбоксиметилцеллюлозу), как эффективный и доступный охлаждающий агент.

3. По результатам исследования можно сделать вывод о том, что искусственная локальная гипотермию может быть использована для абортирования процесса некроза поджелудочной железы в эксперименте.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Leppäniemi A. et al. 2019 WSES guidelines for the management of severe acute pancreatitis //World journal of emergency surgery. – 2019. – Т. 14. – С. 1-20.
- 2 Ouyang G. et al. The global, regional, and national burden of pancreatitis in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 //BMC medicine. – 2020. – Т. 18. – С. 1-13.
- 3 Yu J. et al. Global, regional, and national burden of pancreatitis in older adults, 1990–2019: A systematic analysis for the global burden of disease study 2019 //Preventive Medicine Reports. – 2024. – Т. 41. – С. 102722.
- 4 Beij A. et al. Acute Pancreatitis: An Update of Evidence-Based Management and Recent Trends in Treatment Strategies //United European Gastroenterology Journal. – 2025.
- 5 Sagar A. J., Khan M., Tapuria N. Evidence-based approach to the surgical management of acute pancreatitis //The Surgery Journal. – 2022. – Т. 8. – №. 04. – С. e322-e335.
- 6 Рахметов Н. Р. и др. Гендерные различия в заболеваемости и течении острого панкреатита //Вестник Казахского Национального медицинского университета. – 2020. – №. 4. – С. 343-348.
- 7 Roberts S. E. et al. The incidence and aetiology of acute pancreatitis across Europe //Pancreatology. – 2017. – Т. 17. – №. 2. – С. 155-165.
- 8 Manrai M. et al. Controversies in the management of acute pancreatitis: an update //World Journal of Clinical Cases. – 2023. – Т. 11. – №. 12. – С. 2582.
- 9 Шапошников В.И. К вопросу патогенеза острого деструктивного панкреатита //Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2013. - №. 10-3. – С. 401-405
- 10 Gapp J., Tariq A., Chandra S. Continuing Education Activity. – 2023.
- 11 Baron T. H. et al. American Gastroenterological Association clinical practice update: management of pancreatic necrosis //Gastroenterology. – 2020. – Т. 158. – №. 1. – С. 67-75. e1.
- 12 Lee P. J., Papachristou G. I. New insights into acute pancreatitis //Nature reviews Gastroenterology & hepatology. – 2019. – Т. 16. – №. 8. – С. 479-496.
- 13 Mederos M. A., Reber H. A., Girgis M. D. Acute pancreatitis: a review //Jama. – 2021. – Т. 325. – №. 4. – С. 382-390.
- 14 Jaber S. et al. Guidelines for the management of patients with severe acute pancreatitis, 2021 //Anaesthesia Critical Care & Pain Medicine. – 2022. – Т. 41. – №. 3. – С. 101060.
- 15 Palumbo R., Schuster K. M. Contemporary management of acute pancreatitis: What you need to know //Journal of Trauma and Acute Care Surgery. – 2024. – Т. 96. – №. 1. – С. 156-165.
- 16 Турлыгазы Ж. Б. и др. Причины распространенности острого панкреатита у студентов медицинского вуза //Вестник Казахского Национального медицинского университета. – 2021. – №. 2. – С. 65-69.

- 17 Kozhakhmetov S.K., Rustemova K.R., Iginov N.S. et al. Modern principles of treatment of acute destructive pancreatitis // Bulletin of surgery in Kazakhstan. – 2022. – №. 70. – P. 9-13.
- 18 Lee P. J., Papachristou G. I. Management of severe acute pancreatitis //Current treatment options in gastroenterology. – 2020. – T. 18. – C. 670-681.
- 19 Petrov M. S., Yadav D. Global epidemiology and holistic prevention of pancreatitis //Nature reviews Gastroenterology & hepatology. – 2019. – T. 16. – №. 3. – C. 175-184.
- 20 Li C. et al. The global, regional, and national burden of acute pancreatitis in 204 countries and territories, 1990–2019 //BMC gastroenterology. – 2021. – T. 21. – C. 1-12.
- 21 Singh V. K., Yadav D., Garg P. K. Diagnosis and management of chronic pancreatitis: a review //Jama. – 2019. – T. 322. – №. 24. – C. 2422-2434.
- 22 Van Dijk S. M. et al. Acute pancreatitis: recent advances through randomised trials //Gut. – 2017. – T. 66. – №. 11. – C. 2024-2032.
- 23 Tenner S. et al. American college of gastroenterology guidelines: management of acute pancreatitis //Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG. – 2024. – T. 119. – №. 3. – C. 419-437.
- 24 Zheng Z. et al. A narrative review of the mechanism of acute pancreatitis and recent advances in its clinical management //American journal of translational research. – 2021. – T. 13. – №. 3. – C. 833.
- 25 Guilabert L., Cárdenas-Jaén K., de-Madaria E. Initial Management of Acute Pancreatitis //Gastroenterology Clinics. – 2025. – T. 54. – №. 1. – C. 21-36.
- 26 Wolbrink D. R. J. et al. Management of infected pancreatic necrosis in the intensive care unit: a narrative review //Clinical Microbiology and Infection. – 2020. – T. 26. – №. 1. – C. 18-25.
- 27 Barreto S. G. How does cigarette smoking cause acute pancreatitis? //Pancreatology. – 2016. – T. 16. – №. 2. – C. 157-163.
- 28 Xia C. C. et al. Reactive oxygen species and oxidative stress in acute pancreatitis: Pathogenesis and new therapeutic interventions //World Journal of Gastroenterology. – 2024. – T. 30. – №. 45. – C. 4771.
- 29 Nassar T. I., Qunibi W. Y. AKI associated with acute pancreatitis //Clinical Journal of the American Society of Nephrology. – 2019. – T. 14. – №. 7. – C. 1106-1115.
- 30 Goodchild G., Chouhan M., Johnson G. J. Practical guide to the management of acute pancreatitis //Frontline Gastroenterology. – 2019. – T. 10. – №. 3. – C. 292-299.
- 31 Banks P. A. et al. Classification of acute pancreatitis—2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus //Gut. – 2013. – T. 62. – №. 1. – C. 102-111.
- 32 Jingoniya N. K. et al. Comparative evaluation of BISAP score and computed tomography severity index as a predictor for severity of acute pancreatitis //International Surgery Journal. – 2022. – T. 9. – №. 2. – C. 421-425.

- 33 Hines O. J., Pandol S. J. Management of severe acute pancreatitis //Bmj. – 2019. – T. 367.
- 34 Szatmary P. et al. Acute pancreatitis: diagnosis and treatment //Drugs. – 2022. – T. 82. – №. 12. – C. 1251-1276.
- 35 Walkowska J. et al. Diagnosis and treatment of acute pancreatitis //Diagnostics. – 2022. – T. 12. – №. 8. – C. 1974.
- 36 Beyer G. et al. Clinical Practice Guideline—Acute and Chronic Pancreatitis //Deutsches Arzteblatt International. – 2022. – T. 119. – №. 29-30. – C. 495-501.
- 37 Bulthuis M. C. et al. Acute pancreatitis in COVID-19 patients: true risk? //Scandinavian Journal of Gastroenterology. – 2021. – T. 56. – №. 5. – C. 585-587.
- 38 Venkatesh N. R. et al. Comparison of different scoring systems in predicting the severity of acute pancreatitis: a prospective observational study //Cureus. – 2020. – T. 12. – №. 2.
- 39 Rashid M. U. et al. Pancreatic necrosis: complications and changing trend of treatment //World journal of gastrointestinal surgery. – 2019. – T. 11. – №. 4. – C. 198.
- 40 Rana S. S. An overview of walled-off pancreatic necrosis for clinicians //Expert review of gastroenterology & hepatology. – 2019. – T. 13. – №. 4. – C. 331-343.
- 41 Wolbrink D. R. J. et al. Management of infected pancreatic necrosis in the intensive care unit: a narrative review //Clinical Microbiology and Infection. – 2020. – T. 26. – №. 1. – C. 18-25.
- 42 Pavlek G. et al. Step-Up versus open Approach in the treatment of Acute Necrotizing pancreatitis: a case-matched analysis of clinical outcomes and long-term pancreatic sufficiency //Journal of Clinical Medicine. – 2024. – T. 13. – №. 13. – C. 3766.
- 43 Ning C. et al. Adverse clinical outcomes associated with multidrug-resistant organisms in patients with infected pancreatic necrosis //Pancreatology. – 2019. – T. 19. – №. 7. – C. 935-940.
- 44 Huang D. et al. From "step-up" to "step-jump": a leap-forward intervention for infected necrotizing pancreatitis //Chinese Medical Journal. – 2022. – T. 135. – №. 03. – C. 285-287.
- 45 Schepers N. J. et al. Impact of characteristics of organ failure and infected necrosis on mortality in necrotising pancreatitis //Gut. – 2019. – T. 68. – №. 6. – C. 1044-1051.
- 46 Schepers N. J. et al. Impact of characteristics of organ failure and infected necrosis on mortality in necrotising pancreatitis //Gut. – 2019. – T. 68. – №. 6. – C. 1044-1051.
- 47 Shi N. et al. Duration of organ failure impacts mortality in acute pancreatitis //Gut. – 2020. – T. 69. – №. 3. – C. 604-605.
- 48 Saluja A. et al. Early intra-acinar events in pathogenesis of pancreatitis //Gastroenterology. – 2019. – T. 156. – №. 7. – C. 1979-1993.
- 49 Kim M. J. et al. Silymarin attenuates the severity of cerulein-induced acute pancreatitis //Pancreas. – 2020. – T. 49. – №. 1. – C. 89-95.

- 50 Su Y. et al. High-Fat Diet Aggravates the Intestinal Barrier Injury via TLR4-RIP3 Pathway in a Rat Model of Severe Acute Pancreatitis //Mediators of Inflammation. – 2019. – Т. 2019. – №. 1. – С. 251.
- 51 Kotan R. et al. Hemorheological and microcirculatory relations of acute pancreatitis //Metabolites. – 2022. – Т. 13. – №. 1. – С. 4.
- 52 Tveita T., Sieck G. C. Physiological impact of hypothermia: the good, the bad, and the ugly //Physiology. – 2022. – Т. 37. – №. 2. – С. 69-87.
- 53 Granfeldt A. et al. Targeted temperature management in adult cardiac arrest: systematic review and meta-analysis //Resuscitation. – 2021. – Т. 167. – С. 160-172.
- 54 Dankiewicz J. et al. Hypothermia versus normothermia after out-of-hospital cardiac arrest //New England Journal of Medicine. – 2021. – Т. 384. – №. 24. – С. 2283-2294.
- 55 David O. R. P., Doro F. Industrial fragrance chemistry: a brief historical Perspective //European Journal of Organic Chemistry. – 2023. – Т. 26. – №. 44. – С. e202300900.
- 56 Lansiaux E. et al. Scoop and treat: from an historical controversy to the emergency future //Frontiers in Disaster and Emergency Medicine. – 2024. – Т. 2. – С. 1340.
- 57 Kurisu K. et al. Therapeutic hypothermia and neuroprotection in acute neurological disease //Current Medicinal Chemistry. – 2019. – Т. 26. – №. 29. – С. 5430-5455.
- 58 Johnson N. J. et al. Targeted temperature management at 33 versus 36 degrees: a retrospective cohort study //Critical care medicine. – 2020. – Т. 48. – №. 3. – С. 362-369.
- 59 de Oliveira C. et al. Multimodal transgastric local pancreatic hypothermia reduces severity of acute pancreatitis in rats and increases survival //Gastroenterology. – 2019. – Т. 156. – №. 3. – С. 735-747. e10.
- 60 Клинический протокол министерства здравоохранения и социального развития Республики Казахстан от «29» марта 2019 года Протокол №60 «Острый панкреатит» (К85).
- 61 Kozlov I. Z., Akzhigitov G. N., Kaplan L. D. Role of local gastric hypothermia in the complex treatment of acute pancreatitis // Sovetskaia meditsina. – 1969. – Т. 32. – №. 10. – С. 74-78.
- 62 Babris I. V. Local hypothermia in the complex treatment of acute pancreatitis // Vestnik khirurgii imeni II Grekova. – 1972. – Т. 109. – №. 9. – С. 62.
- 63 Vasil'kiv V. G. Local hypothermia in the intensive therapy of acute pancreatitis // Anesteziologiya i reanimatologiya. – 1977. – №. 6. – С. 71-74.
- 64 Шалимов А.А., Шалимов С.А. // Гипотермия в хирургии поджелудочной железы. – Клиническая хирургия. 1982г. С.1-7
- 65 Fang Y. U. et al. A metabonomic study of intragastric local hypothermia intervention in rats with pancreatitis //Chinese Journal of Emergency Medicine. – 2023. – С. 1206-1214.
- 66 Абрамов Г. и др. Панкреонекроз. Background //Вестник Казахского национального медицинского университета. – 2019. – №. 4. – С. 22-25.

67 Шапошников В.И. Оценка местной гипотермии в профилактике послеоперационного деструктивного панкреатита // Успехи современного естествознания – 2003. - №5 – С. 101-102

68 Морозова А.Б. Применение локальной гипотермии поджелудочной железы в комплексном лечении больных с острым деструктивным панкреатитом: дис. – Российский университет дружбы народов (РУДН), 2011

69 Шугаев А. И., Гера И. Н. Способ и устройство для эндовидеохирургической визуализации, динамического наблюдения и проведения лечебной гипотермии поджелудочной железы. – 2003. Патент RU 2199937 С2

70 Gunn A. J. et al. Therapeutic hypothermia translates from ancient history in to practice //Pediatric research. – 2017. – Т. 81. – №. 1. – С. 202-209.

71 Zhan L. et al. Pancreatic islet cryopreservation by vitrification achieves high viability, function, recovery and clinical scalability for transplantation //Nature medicine. – 2022. – Т. 28. – №. 4. – С. 798-808.

72 Safdar m., özaslan m. Biochemistry: essential molecules for life //Chemistry for the Life. – 2023. – С. 185.

73 Heitzer E. et al. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology //Nature Reviews Genetics. – 2019. – Т. 20. – №. 2. – С. 71-88.

74 Alix-Panabières C., Pantel K. Liquid biopsy: from discovery to clinical application //Cancer discovery. – 2021. – Т. 11. – №. 4. – С. 858-873.

75 Kalluri R., LeBleu V. S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes //science. – 2020. – Т. 367. – №. 6478. – С. eaau6977.

76 Zhou Y. et al. The role of exosomes and their applications in cancer //International journal of molecular sciences. – 2021. – Т. 22. – №. 22. – С. 12204.

77 Bronkhorst A. J. et al. New perspectives on the importance of cell-free DNA biology //Diagnostics. – 2022. – Т. 12. – №. 9. – С. 2147.

78 Jiang P. et al. Plasma DNA end-motif profiling as a fragmentomic marker in cancer, pregnancy, and transplantation //Cancer Discovery. – 2020. – Т. 10. – №. 5. – С. 664-673.

79 Mendez-Dorantes C., Burns K. H. LINE-1 retrotransposition and its deregulation in cancers: implications for therapeutic opportunities //Genes & development. – 2023. – Т. 37. – №. 21-24. – С. 948-967.

80 Gong T. et al. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases //Nature Reviews Immunology. – 2020. – Т. 20. – №. 2. – С. 95-112.

81 Tosar J. P., Witwer K., Cayota A. Revisiting extracellular RNA release, processing, and function //Trends in Biochemical Sciences. – 2021. – Т. 46. – №. 6. – С. 438-445.

82 AlZaabi A., Shalaby A. A Systematic Review of Diagnostic Performance of Circulating MicroRNAs in Colorectal Cancer Detection with a Focus on Early-Onset Colorectal Cancer //International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Т. 25. – №. 17. – С. 9565.

83 Фоменко Ю. М. Внеклеточные нуклеиновые кислоты и катаболиты пуринов при комбинированной терапии местно-распространенного рака шейки матки. – 2019.

84 Wu Z., Sainz A. G., Shadel G. S. Mitochondrial DNA: cellular genotoxic stress sentinel //Trends in biochemical sciences. – 2021. – Т. 46. – №. 10. – С. 812-821.

85 Shendure J., Findlay G. M., Snyder M. W. Genomic medicine—progress, pitfalls, and promise //Cell. – 2019. – Т. 177. – №. 1. – С. 45-57.

86 Heitzer E. et al. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology //Nature Reviews Genetics. – 2019. – Т. 20. – №. 2. – С. 71-88.

87 Duvvuri B., Lood C. Cell-free DNA as a biomarker in autoimmune rheumatic diseases //Frontiers in immunology. – 2019. – Т. 10. – С. 502.

88 Esfahani M. S. et al. Inferring gene expression from cell-free DNA fragmentation profiles //Nature biotechnology. – 2022. – Т. 40. – №. 4. – С. 585-597.

89 Муравлёва Л. Е. и др. Внеклеточные нуклеиновые кислоты в крови больных с хронической почечной недостаточностью // Международный журнал экспериментального образования. – 2014. – С. 75-77.

90 Zierhut C., Funabiki H. Regulation and consequences of cGAS activation by self-DNA //Trends in cell biology. – 2020. – Т. 30. – №. 8. – С. 594-605.

91 Martins S. G. et al. Linking oxidative stress and DNA damage to changes in the expression of extracellular matrix components //Frontiers in genetics. – 2021. – Т. 12. – С. 673002.

92 Tosar J. P., Witwer K., Cayota A. Revisiting extracellular RNA release, processing, and function //Trends in Biochemical Sciences. – 2021. – Т. 46. – №. 6. – С. 438-445.

93 Lin Q. et al. Prognostic stratification of sepsis through DNA damage response based RiskScore system: insights from single-cell RNA-sequencing and transcriptomic profiling //Frontiers in Immunology. – 2024. – Т. 15. – С. 1345321.

94 Ginneken I. Exploring the use of cell-free nucleic acids as biomarkers for ex vivo heart function : дис. – 2022.

95 Aslami H. et al. Induced hypothermia is associated with reduced circulating subunits of mitochondrial DNA in cardiac arrest patients //Mitochondrial DNA Part A. – 2018. – Т. 29. – №. 4. – С. 525-528.

96 Basnayake C., Ratnam D. Blood tests for acute pancreatitis // Australian Prescriber - Volume 38, Issue 4, 1 August 2015, Pages 128-130

97 Leppäniemi A. et al. 2019 WSES guidelines for the management of severe acute pancreatitis //World journal of emergency surgery. – 2019. – Т. 14. – С. 1-20.

98 Зеленская Е. А. и др. Современные подходы к лечению острого панкреатита-раннее энтеральное и парентеральное питание //Вестник Казахского Национального медицинского университета. – 2020. – №. 1. – С. 259-261.

99 Furey C., Vuxbaum J., Chambliss A.B. A review of biomarker utilization in the diagnosis and management of acute pancreatitis reveals amylase ordering is

favoured in patients requiring laparoscopic cholecystectomy *Clinical Biochemistry* // Volume 77, March 2020, Pages 54-56.

100 Cardoso F.S., Ricardo L.B., Oliveira A.M., Canena J.M., Horta D.V., Papoila A.L., Deus J.R. C-reactive protein prognostic accuracy in acute pancreatitis: Timing of measurement and cutoff points // *Gastroenterology and Hepatology* - Volume 25, Issue 7, July 2013, Pages 784-789

101 Khan H. S., Ayyaz M., Hanif M. Peak Serum Creatinine as a Biomarker of Pancreatic Necrosis in Acute Pancreatitis: A Cross-Sectional Study: Serum Creatinine as a Biomarker of Pancreatic Necrosis in Acute Pancreatitis // *Pakistan Journal of Health Sciences*. – 2024. – C. 163-168.

102 Pando E. et al. Early Changes in Blood Urea Nitrogen (BUN) Can Predict Mortality in Acute Pancreatitis: Comparative Study between BISAP Score, APACHE-II, and Other Laboratory Markers—A Prospective Observational Study // *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*. – 2021. – T. 2021. – №. 1. – C. 6643595.

103 Langmead C. et al. A novel 5-cytokine panel outperforms conventional predictive markers of persistent organ failure in acute pancreatitis // *Clinical and translational gastroenterology*. – 2021. – T. 12. – №. 5. – C. e00351.

104 Lipinski M., Rydzewski A., Rydzewska G. Early changes in serum creatinine level and estimated glomerular filtration rate predict pancreatic necrosis and mortality in acute pancreatitis: creatinine and eGFR in acute pancreatitis // *Pancreatology*. – 2013. – T. 13. – №. 3. – C. 207-211.

105 Rainio M. et al. Serum serine peptidase inhibitor Kazal-type 1, trypsinogens 1 to 3, and complex of trypsin 2 and α 1-antitrypsin in the diagnosis of severe acute pancreatitis // *Pancreas*. – 2019. – T. 48. – №. 3. – C. 374-380.

106 Shu W. et al. Initially elevated arterial lactate as an independent predictor of poor outcomes in severe acute pancreatitis // *BMC gastroenterology*. – 2020. – T. 20. – C. 1-9.

107 Zhang Y. et al. Decreased high density lipoprotein cholesterol is an independent predictor for persistent organ failure, pancreatic necrosis and mortality in acute pancreatitis // *Scientific reports*. – 2017. – T. 7. – №. 1. – C. 8064.

108 Feher K. E. et al. Non-pancreatic hyperlipasemia: A puzzling clinical entity // *World Journal of Gastroenterology*. – 2024. – T. 30. – №. 19. – C. 2538.

109 Yamamoto M. et al. Clinical practice guidelines for the management of liver metastases from extrahepatic primary cancers 2021 // *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*. – 2021. – T. 28. – №. 1. – C. 1-25.

110 Fisher O., Benson R. A., Imray C. H. E. The clinical application of purine nucleosides as biomarkers of tissue Ischemia and hypoxia in humans in vivo // *Biomarkers in medicine*. – 2019. – T. 13. – №. 11. – C. 953-964.

111 Li Y. et al. Analysis of metabolites in gout: a systematic review and meta-analysis // *Nutrients*. – 2023. – T. 15. – №. 14. – C. 3143.

112 Jia Y. et al. Blood Plasma Metabolic Profile of Newborns with Hypoxic-Ischaemic Encephalopathy by GC-MS // *BioMed Research International*. – 2021. – T. 2021. – №. 1. – C. 6677271.

113 del Castillo Velasco-Martínez I. et al. Purine metabolism in response to hypoxic conditions associated with breath-hold diving and exercise in erythrocytes and plasma from bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) // *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. – 2016. – Т. 191. – С. 196-201.

114 Meng X., Wang S.-C., Shan J.-J., Xu J.-Y., Shen C.-S., Xie T. Regulation of Jinxin Oral Liquid on metabolites in spleen of mice with RSV pneumonia based on GC-MS // *Chinese Traditional and Herbal Drugs* // Volume 47, Issue 24, 28 December 2016, Pages 4408-4415.

115 Zuccarini M. et al. Uncovering the signaling pathway behind extracellular guanine-induced activation of NO system: new perspectives in memory-related disorders // *Frontiers in Pharmacology*. – 2018. – Т. 9. – С. 110.

116 Estimation of purine catabolism in patients with acute myocardial infarction / L. Muravlyova, A. Turmukhambetova, O. Visternichan [et al.] // *Acta Medica Mediterranea*. – 2020. – Vol. 36. – No 2. – P. 877-882. – DOI 10.19193/0393-6384_2020_2_138.

117 Влияние арглабина на внеклеточные нуклеиновые кислоты и метаболиты пуринового обмена у больных местно-распространенным раком молочной железы / С. С. Жумакаева, Л. Е. Муравлева, И. М. Омарова [и др.] // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2016. – Т. 15. – № 1. – С. 38-39.

118 Метаболиты пуринового обмена в плазме крови больных с хронической болезнью почек различной степени тяжести / Е. А. Колесникова, И. В. Бейникова, А. С. Нургалиева [и др.] // *Академический журнал Западной Сибири*. – 2015. – Т. 11. – № 1(56). – С. 16.

119 Luo X. M. et al. The purine metabolite inosine monophosphate accelerates myelopoiesis and acute pancreatitis progression // *Communications Biology*. – 2022. – Т. 5. – №. 1. – С. 1088.

120 Fisher O., Benson R. A., Imray C. H. E. The clinical application of purine nucleosides as biomarkers of tissue Ischemia and hypoxia in humans in vivo // *Biomarkers in medicine*. – 2019. – Т. 13. – №. 11. – С. 953-964.

121 Manna T. et al. Anticancer potential and structure activity studies of purine and pyrimidine derivatives: an updated review // *Molecular Diversity*. – 2025. – Т. 29. – №. 1. – С. 817-848.

122 Pagliaro P. et al. Role of temperature in myocardial ischemic injury and protection by conditioning // *Conditioning medicine*. – 2020. – Т. 3. – №. 1. – С. 31-46.

123 Goetzman E. et al. Serum metabolomics reveals distinct profiles during ischemia and reperfusion in a porcine model of myocardial ischemia–reperfusion // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Т. 23. – №. 12. – С. 6711.

124 Cherin T. et al. The effect of normothermic and hypothermic hypoxia–ischemia on brain hypoxanthine phosphoribosyl transferase activity // *Neurological research*. – 2006. – Т. 28. – №. 8. – С. 831-836.

125 Гущин Я. И. и др. Сравнительная морфология поджелудочной железы экспериментальных животных и человека //Лабораторные животные для научных исследований. – 2018. – №. 3. – С. 33-48.

126 Макарова М. Н. и др. Анатомо-физиологическая характеристика пищеварительного тракта у человека и лабораторных животных //Международный вестник ветеринарии. – 2016. – №. 1. – С. 82-104.

127 Underwood W., Anthony R. AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2020 edition //Retrieved on March. – 2020. – Т. 2013. – №. 30. – С. 2020-1.

128 Орешников Е.В., Гунин А.Г., Мадьянов И.В. и др. Пурины крови и ликвора во время беременности // Проблемы репродукции. – 2008. – № 6. – С. 74-80.

129 Маркушева Л. И. и др. Ядерные белки хроматина в оценке эффективности лечения больных псориазом //Клиническая лабораторная диагностика. – 2000. – №. 7. – С. 18-20

130 Арбошкин В. А. и др. Изучение вариантной анатомии поджелудочной железы лабораторного животного (кролика) //Acta Biomedica Scientifica. – 2013. – №. 1 (89).

131 Mohammed Y. A. Histological and ultrastructural studies of the pancreas of native rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) //Iraqi Journal of Veterinary Sciences. – 2019. – Т. 33. – №. 2.

132 Iannuzzi J. P. et al. Global incidence of acute pancreatitis is increasing over time: a systematic review and meta-analysis //Gastroenterology. – 2022. – Т. 162. – №. 1. – С. 122-134.

133 Abramov G. et al. Experimental model of pancreonecrosis induced by auto-bile injection //Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences. – 2020. – Т. 8. – №. A. – С. 472-475.

134 Yang X. et al. Experimental acute pancreatitis models: history, current status, and role in translational research //Frontiers in Physiology. – 2020. – Т. 11. – С. 614591.

135 Guseynov N. A. et al. Local hardware hypothermia influence on the physiological processes //RUDN Journal of Medicine. – 2022. – Т. 26. – №. 3. – С. 243-258.

136 de Oliveira C. et al. Multimodal transgastric local pancreatic hypothermia reduces severity of acute pancreatitis in rats and increases survival //Gastroenterology. – 2019. – Т. 156. – №. 3. – С. 735-747. e10.

137 Abramov G. et al. Intermediate products of purine metabolism in an experimental model of pancreatic necrosis //Acta Bio Medica: Atenei Parmensis. – 2022. – Т. 93. – №. 6. – С. e2022298.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Решение Комитета по биоэтике НАО «Медицинский университет Караганды»

Решение Комитета по биоэтике НАО «Медицинского университета Караганды»

Заседание № 20 _____
Протокол № 20 _____

Дата (Д/М/Г) 17.06.2019г.
Присвоенный номер 58__

Название протокола: «Внеклеточные нуклеиновые кислоты и пурины при панкреонекрозе и на фоне гипотермии».					
Основной исследователь:	Абрамов Григорий Александрович				
Институт:	НАО МУК				
Рассмотренные элементы	<input checked="" type="checkbox"/> Приложены <input type="checkbox"/> Не приложены				
Повторное рассмотрение <input type="checkbox"/> да <input checked="" type="checkbox"/> Нет	Дата предыдущего рассмотрения:				
Решение:	<input checked="" type="checkbox"/> Разрешено (Р) <input type="checkbox"/> Разрешено с рекомендациями (Рек) <input type="checkbox"/> Повторная заявка (ПЗ) <input type="checkbox"/> Не разрешено (НР)				
№.	Голосование членов КБЭ	решение			
		Р	Рек	ПЗ	НР
1.	Молотов-Лучанский В.Б.	✓			
2.	Мацевская Л.Л.	✓			
3.	Куаныш Ж.М.	✓			
4.	Агеев Д.В.	✓			
5.	Бадыров Р.М.				
6.	Бакирова Р.Е.	✓			
7.	Битнер Е.С.	✓			
8.	Блок О.Г.	✓			
9.	Вистерничан О.А.	✓			
10.	Калиева Ш.С.	✓			
11.	Касапиди Д.И.	✓			
12.	Омаркулов Б.К.	✓			
13.	Понамарева О.А.	✓			
14.	Сорокина М.А.	✓			
15.	Тулеутаева С.Т.	✓			
16.	Никифорова С.А.	✓			

Примечание: Р - Разрешено; Рек - Разрешено с рекомендациями;
ПЗ - Повторная заявка; НР - Не разрешено

Подпись: _____

Председатель: *д.м.н., профессор*
Молотов-Лучанский В.Б.

Дата: 17.06.2019г.



.....
Ответственный секретарь
Куаныш Ж.М.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Акты внедрения результатов научно-исследовательской работы

«УТВЕРЖДАЮ»
Проректор по стратегическому
развитию и науке НАО «МУК»

Гурмухамбетова А.А.
“ 22 ” 2021 г.



АКТ о внедрении результатов научно-исследовательской работы

Научно-исследовательский центр НАО
«Медицинский Университет Караганды»
(наименование учреждения, где внедряется)

Наименование предложения: «МОДЕЛИРОВАНИЕ ПАНКРЕОНЕКРОЗА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ»

Работа включена: из докторской диссертационной работы «Влияние искусственной локальной гипотермии на динамику морфологических изменений и биохимических показателей крови на модели панкреонекроза» Абрамова Григория Александровича, по специальности 6D110100 «Медицина»

Форма внедрения: Внедрение модели заболевания для экспериментальных научных исследований

(Внедрение методики, аппарата в лечебно-профилактическое учреждение, лекции)

Ответственные за внедрение и исполнители: Абрамов Г.А., Шакеев К.Т., Тусупбекова М.М., Шестаков Д.В., Жуманбаев С.М.

Эффективность внедрения: научно-исследовательская
Лечебно-диагностическая, экономическая

Предложения и замечания учреждения осуществляющего внедрения

Сроки внедрения: 2020-2021

Председатель комиссии
И.о. директора НИЦ НАО МУК Ахмалтдинова Л.Л.

Члены ответственные за внедрение:
Докторант PhD НАО МУК
Магистр медицины Абрамов Г.А.

Профессор кафедры
хирургических болезней, д.м.н. Шакеев К.Т.

Профессор кафедры
патологии, д.м.н. Тусупбекова М.М.

Интерн НАО МУК Шестаков Д.В.

Интерн НАО МУК Жуманбаев С.М.



ПРИЛОЖЕНИЕ В

Свидетельства о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты, охраняемые авторским правом

КАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ

РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН



СВИДЕТЕЛЬСТВО
О ВНЕСЕНИИ СВЕДЕНИЙ В ГОСУДАРСТВЕННЫЙ РЕЕСТР
ПРАВ НА ОБЪЕКТЫ, ОХРАНЯЕМЫЕ АВТОРСКИМ ПРАВОМ

№ 7190 от «23» декабря 2019 года

Фамилия, имя, отчество, (если оно указано в документе, удостоверяющем личность) автора (ов):
АБРАМОВ ГРИГОРИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ, ШАКЕЕВ КАЙРАТ ТАНАБАЕВИЧ, ТУСУШЕКОВА
МАЙДА МАСХАПОВНА, ТАГАЕВ ЕРМЕК ЕРІАНУЛЫ, ШЕСТАКОВ ДМИТРИЙ ВЛАДИМИРОВИЧ,
ЖУМАНБАЕВ САНЖАР МУРАТОВИЧ

Вид объекта авторского права: **произведение науки**

Название объекта: **Моделирование панкреонекроза в эксперименте**

Дата создания объекта: **20.11.2019**



Құжат түпнұсқалығын <http://www.kazpatent.kz/ru> сайтының
"Авторлық құқық" бөлімінде тексеруге болады. <https://copyright.kazpatent.kz>
Подлинность документа возможно проверить на сайте [kazpatent.kz](https://copyright.kazpatent.kz)
в разделе «Авторское право» <https://copyright.kazpatent.kz>

Подписано ЭЦП

Оспанов Е. К.

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

СВИДЕТЕЛЬСТВО

О ВНЕСЕНИИ СВЕДЕНИЙ В ГОСУДАРСТВЕННЫЙ РЕЕСТР
ПРАВ НА ОБЪЕКТЫ, ОХРАНЯЕМЫЕ АВТОРСКИМ ПРАВОМ

№ 14050 от «23» декабря 2020 года

Фамилия, имя, отчество, (если оно указано в документе, удостоверяющем личность) автора (ов):
АБРАМОВ ГРИГОРИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ, ШЕСТАКОВ ДМИТРИЙ ВЛАДИМИРОВИЧ,
ЖУМАНБАЕВ САНЖАР МУРАТОВИЧ

Вид объекта авторского права: произведение науки

Название объекта: ВЫБОР НАИБОЛЕЕ ЭФФЕКТИВНОГО ОХЛАЖДАЮЩЕГО АГЕНТА МЕТОДОМ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ТЕМПЕРАТУРНОГО ПОЛЯ В СТЕНДОВОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА
БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЯХ.

Дата создания объекта: 12.11.2020



Құжат тұлғасына қатысты: <http://www.kazpatent.kz/ru> сайтының
"Авторлық құқық" бөлімінде тексеруге болады. <https://copyright.kazpatent.kz>

Подлинность документа возможно проверить на сайте kazpatent.kz
в разделе «Авторское право» <https://copyright.kazpatent.kz>

Подписано ЭЦП

Оспанов Е.К.

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

СВИДЕТЕЛЬСТВО

О ВНЕСЕНИИ СВЕДЕНИЙ В ГОСУДАРСТВЕННЫЙ РЕЕСТР ПРАВ НА ОБЪЕКТЫ, ОХРАНЯЕМЫЕ АВТОРСКИМ ПРАВОМ

№ 14953 от «8» февраля 2021 года

Фамилия, имя, отчество, (если оно указано в документе, удостоверяющем личность) автора (ов):
**АБРАМОВ ГРИГОРИЙ А.ЛЕКСАНДРОВИЧ, ШЕСТАКОВ ДМИТРИЙ ВЛАДИМИРОВИЧ,
ТУСУПБЕКОВА МАЙДА МАСХАПОВНА, ШАКЕЕВ КАЙРАТ ТАНАБАЕВИЧ, ЖУМАНБАЕВ
САНЖАР МУРАТОВИЧ**

Вид объекта авторского права: **произведение науки**

Название объекта: **Методика проведения интраоперационной искусственной локальной гипотермии при
панкреонекрозе в эксперименте на животных**

Дата создания объекта: **05.02.2021**



Құжат танысқанығын <http://www.kazpatent.kz/ru> сайтының
"Авторлық құқық" бөлімінде тексеруге болады. <https://copyright.kazpatent.kz>

Подлинность документа возможно проверить на сайте kazpatent.kz
в разделе «Авторское право» <https://copyright.kazpatent.kz>

Подписано ЭЦП

Оспанов Е.К.