

АННОТАЦИЯ
диссертационной работы
АБРАМОВА ГРИГОРИЯ АЛЕКСАНДРОВИЧА
на тему: «Влияние искусственной локальной гипотермии на динамику
морфологических изменений и биохимических показателей крови в
экспериментальной модели панкреонекроза»
на соискание степени доктора философии (PhD)
по специальности 6D110100 – Медицина

Научные консультанты:

Д.м. н., профессор К.Т. Шакеев

Д.м. н., профессор М.М. Тусупбекова

К.м. н., ассоциированный профессор О.А. Понамарева

MD, PhD J.Alberton

Актуальность проблемы. Несмотря на внедрение в клиническую практику высокоинформативных методов исследования при острых панкреатитах (ОП) и панкреонекрозах (ПН), использование эффективных способов медикаментозной терапии частота неудовлетворительных результатов лечения данной категории больных указывает на нерешенность данной проблемы [Karakayali F. Y., 2014].

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 [Kurti F. et al., 2015; Munigala S., Yadav D., 2016]. Деструктивные формы острого панкреатита, по данным разных авторов, наблюдается у 20-44% больных, вызывая органную недостаточность со смертностью до 30-47% [Бородин Н. А. и др., 2015; Имаева А.К., Мустафин Т.И., Шарифгалиев И.А., 2014].

В проведенном анализе острых хирургических заболеваний органов брюшной полости с 2002 по 2016 год в Центральном Казахстане, число пациентов с острым панкреатитом находится на 1 месте и составляет 29,3%. При этом послеоперационная летальность до 6 часов составляет 18,8%, от 6 до 24 часов 26,9%, позже 24 часов 33,6%. [Булешов М. А., 2017].

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 [Roberts S. E. et al., 2017.; Винник Ю. С. и др., 2009].

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 широко 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. Все это указывает на тот факт, что применение методики искусственной локальной гипотермии при тяжелых формах панкреатита требует пересмотра и новых экспериментальных и клинических обоснований.

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, тирпсинингибирующую активность, уровень катионных белков нейтрофильных лейкоцитов до наложения гипотермии и после нее. После завершения охлаждения измеряли температуру ПЖ. После измерения температуры ПЖ животное усыплялось [Шапошников В.И., 2013]. Но в данной работе не изучалась динамика течения экспериментального панкреатита. В работе de Oliveira С. с соавторами у крыс воспроизводилась церулеиновая модель острого панкреатита, далее им проводилась трансгастральная гипотермия. По результатам у крыс с острым панкреатитом трансгастральная локальная гипотермия поджелудочной железы снижает частоту панкреонекроза, апоптоза, воспаления и маркеры тяжести панкреатита, а также увеличивает выживаемость [de Oliveira С. et al., 2019].

Таким образом, локальная гипотермия, как направленный метод лечения ведет к прерыванию цепи патологического процесса и изменению клинико-анатомической картины заболевания, который может быть зарегистрирован морфологическими тестами или результатами лабораторных анализов.

Данная работа посвящена изучению влияния ИЛГ на течение экспериментального панкреонекроза, путем проведения оценки динамики морфологической картины и изменения биохимических показателей крови. Отличается от ранее проведенных работ тем, что гипотермия накладывается по самостоятельно разработанному методу, интраоперационно сразу после введения аутожелчи в паренхиму железы (авторская модель панкреонекроза). Динамика течения экспериментального панкреонекроза под влиянием ИЛГ отслеживается в течении 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»);

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»);

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»);

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 холодовым агентом для оценки терапевтического эффекта гипотермии на течение экспериментального панкреонекроза определен аккумулятор холода карбосиметилцеллюлоза, 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 интраоперационной проведения 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.

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.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 8 научных работ, из них: 2 публикации в международных научных изданиях, входящих на дату публикации 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.

Материалы и методы

Для достижения цели и задач диссертационного исследования было взято 63 лабораторных животных. Кролики были разделены на 4 группы. Первая группа включала в себя интактных животных (n=9), которые были необходимы для промежуточного контроля, калибровки аппаратуры. Во второй группе - моделировался панкреонекроз (n=18). Третья группа включала животных с моделированием панкреонекроза и наложением искусственной локальной гипотермии (n=18). Четвертая группа (Sham-операция) состояла из кроликов, которым проводилось вскрытие брюшной полости и ее ушивание (n=18).

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.

Для выбора наиболее эффективного охлаждающего агента, с целью создания искусственной локальной гипотермии был проведен стендовый эксперимент.

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 - $401,7 \pm 107,6$ У/л ($p=0,005$), 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.

Исполнитель: Абрамов Г.А.