

Разработка и доклиническое тестирование технологий флуоресцентной визуализации патологических процессов в хирургии

Актуальность исследования

Интраоперационный мониторинг и количественная оценка ранних ишемических изменений с помощью авто- и индуцированной флуоресценции при операциях на сердце важен для оптимизации тактики оперативного вмешательства и кардиоанестезиологической поддержки и кардиопротекции. Все большее внимание привлекают возможности интраоперационной флуоресцентной визуализации адекватности кровоснабжения органов в зоне хирургического вмешательства. Внедрение лапароскопических технологий и аппаратных способов разъединения и сшивания тканей позволило существенно снизить количество периоперационных осложнений, однако несостоятельность хирургического шва до сих пор является наиболее частой причиной послеоперационной смертности после бариарических и онкологических операций (с развитием перитонита, абсцесса, сепсиса или формированием наружного свища), а в ряде исследований показана ассоциация частоты развития несостоятельности анастомоза после онкологических операций с риском рецидива заболевания. В данном случае флуоресцентная визуализация находит применение не только в диагностике патологического процесса, но и как инструмент для изучения механизмов его развития.

Научная платформа

Инновационные фундаментальные технологии в медицине

Научные подразделения исполнители (с указанием руководителя исследования)

Руководитель исследования - Галагудза Михаил Михайлович, директор Института экспериментальной медицины ФГБУ "СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова" Минздрава России, д.м.н., член корр. РАН

Исполнители:

Центр доклинических трансляционных исследований Института экспериментальной медицины

НИО микроциркуляции и метаболизма миокарда Института экспериментальной медицины

НИЛ нанотехнологий Института экспериментальной медицины

НИГр экспериментальной патоморфологии Института экспериментальной медицины

НИЛ хирургической коррекции метаболических нарушений Института эндокринологии

Ключевые слова

Автофлуоресценция, индоцианин, миокард, ишемия, головной мозг, несостоятельность анастомоза

Цель проекта

Разработка и доклиническое тестирование оборудования для интраоперационной флуоресцентной визуализации ишемически-реперфузионного повреждения миокарда, а также интраоперационной флуоресцентной визуализации адекватности кровоснабжения полых органов желудочно-кишечного тракта (желудок, тонкая кишка) в зоне наложения аппаратного шва

Задачи проекта

1. Изучить зависимость величины области ИК-флуоресценции индоцианина зелёного от выраженности ишемически-реперфузионного повреждения миокарда путём сравнения ее с размерами зоны некроза, определяемой стандартным гистохимическим методом.
2. Разработать методику оценки ранних проявлений ишемического повреждения миокарда на основе одновременного мониторинга уровня флуоресценции NADH и FAD.

3. Разработать методику интраоперационной ИК-флуоресцентной визуализации органов желудочно-кишечного тракта с использованием в качестве флуорофора индоцианина зеленого.
4. Разработать методику интраоперационной NADH/FAD флуоресцентной спектроскопии органов желудочно-кишечного тракта.
5. Разработать методику интраоперационной оценки микроциркуляции органов брюшной полости (желудок, тонкая кишка) с помощью лазерной доплерографии в условиях лапароскопии.

Достигнутые результаты проекта

На модели регионарной ишемии миокарда у крыс получены и опубликованы доказательства возможности использования ИК-флуоресценции индоцианина зелёного для интраоперационной диагностики ишемического-реперфузионного повреждения миокарда. Разработан способ диагностики ишемического-реперфузионного повреждения при выполнении кардиохирургических операций на открытом сердце, который заявлен как изобретение: «Способ интраоперационной визуализации ишемически-реперфузионного повреждения миокарда» (№ заявки 2016130494/14(047475)). Результаты исследования доложены на ESC конгрессе: Pochkaeva E.I., Sonin D.L., Larionov A. A., Papayan G.V., Petrishchev N.N., Chefu S. G., Minasian S. M., Galagudza M. M. Fluorescent indocyanine green imaging enables in vivo and ex vivo quantification of myocardial infarct size/ ESC Congress 2016, Рим (Италия). Опубликована статья в журнале Biomedical Optics Express: Sonin D., Papayan G., Pochkaeva E., Chefu S., Minasian S., Kurapeev D., Vaage J., Petrishchev N., Galagudza M. In vivo visualization and ex vivo quantification of experimental myocardial infarction by indocyanine green fluorescence imaging/Biomedical Optics Express. – 2017. – Vol.8. – №1. – P. 151-161.

Также на модели регионарной ишемии миокарда у крыс получены, но не опубликованы данные о динамике накопления ИЦЗ в зоне повреждения и его выведения из неповреждённого миокарда, что позволило установить оптимальное время визуализации ишемически-реперфузионного повреждения.

Разработаны новые методы: 1) метод интраоперационной NADH-флуоресцентной визуализации органов желудочно-кишечного тракта и 2) методика интраоперационной оценки микроциркуляции органов брюшной полости (желудок, тонкая кишка) с помощью лазерной доплерографии в условиях ишемии и реперфузии в эксперименте *in vivo*.

На данный момент проводится разработка экспериментального образца программно-аппаратного комплекса для оценки NADH и FAD по спектрам автофлуоресценции ишемизированного миокарда и других тканей в состоянии ишемии.

Ожидаемые результаты проекта

Ожидается получение экспериментального подтверждения возможности использования ИК флуоресцентной визуализации для интраоперационного выявления ишемически-реперфузионного повреждения на различных сроках от возникновения ишемии миокарда (90 минут, 24 часа).

Ожидается получение экспериментального подтверждения возможности использования ИК флуоресцентной визуализации и NADH/FAD спектроскопии для интраоперационного выявления предикторов несостоятельности аппаратного шва при хирургических (бариатрических и онкологических) оперативных вмешательствах на органах брюшной полости. Полученные данные позволят предложить оптимальную методику интраоперационной оценки жизнеспособности тканей органов в области аппаратного шва при выполнении бариатрических и онкологических вмешательств, что позволит своевременно корректировать хирургическую тактику и будет способствовать снижению количества тяжелых, в том числе фатальных осложнений.

Результаты исследования будут доложены на международных хирургических конференциях, опубликованы в виде статей в международных журналах, будут использоваться в обучении на научно-практических семинарах.

Назначение и предполагаемое использование (внедрение) результатов проекта

Разрабатываемый способ визуализации ишемического-реперфузионного повреждения может быть использован для интраоперационной диагностики ишемического повреждения миокарда, в т.ч. инфаркта миокарда. Применение способа в практике позволит влиять на ход проведения кардиохирургической операции в случае необходимости коррекции тактики проведения операции по результатам контроля перфузии и возникновения ишемического-реперфузионного повреждения. Методика может также оказать влияние на послеоперационное ведение пациентов, у которых было выявлено значимое ишемическое-реперфузионное повреждение сердца. Данный способ имеет потенциал вписаться в существующий процесс лечения больных, с возможностью не только повысить его эффективность, но и улучшить экономические показатели благодаря недорогим средствам, требуемым для его применения.

Разрабатываемый способ флуоресцентной детекции ранних признаков несостоятельности аппаратного шва может быть использован с целью влияния на тактику, ход и результат операции при бариатрических и онкологических оперативных вмешательствах на органах брюшной полости, выполняемых открыто и лапароскопически. Данный способ позволит уменьшить количество наиболее тяжелых хирургических осложнений, повысить безопасность операций в бариатрической хирургии и онкологии и, соответственно, снизить расходы здравоохранения на лечение тяжелых осложнений

Описание научного исследования

Способ выявления ишемии миокарда базируется на изменении внутриклеточного редокс-состояния дыхательного кофермента пиридиннуклеотида (НАД), который в клетке может существовать в окисленной (НАД⁺) и восстановленной формах (НАДН). При ишемии из-за нарушения окисления через цепь митохондриального транспорта электронов, имеющийся в норме баланс между ними нарушается в пользу восстановленной формы. Благодаря тому, что восстановленная форма при возбуждении ультрафиолетовыми лучами (320-380 нм) обладает интенсивной флуоресценцией в сине-зеленой области спектра (420-480 нм), появляется возможность обнаруживать ткань, находящуюся в условиях ишемии (Mayevsky, Rogatsky, 2007). Для локализации зоны ишемии нужно оценивать интенсивность аутофлуоресценции в ткани. Это можно делать либо спектроскопическим способом с помощью волоконно-оптического зонда, либо путем формирования аутофлуоресцентных изображений с помощью специальной телевизионной техники (Paryan et al., 2014). Информация, содержащаяся в изображении, богаче, чем при получении точечных данных. Она позволяет хирургу увидеть всю зону ишемии миокарда, что способствует оперативному и более правильному принятию решения по тактике действий.

Недостаток этого способа состоит в том, что такая визуализация требует затемнения операционной комнаты, чтобы избежать влияния внешней засветки на сигнал аутофлуоресценции.

Задачей настоящей разработки является повышение удобства и достоверности оценки ишемически-реперфузионного повреждения миокарда путем визуализации зоны ишемического повреждения в свете ближней инфракрасной (ИК) флуоресценции с использованием флуоресцентного красителя индоцианина зеленого. Применение методики обеспечивает возможность проведения исследований в условиях незатемненной операционной комнаты, анализа обратимого и необратимого повреждения миокарда в зависимости от времени с момента введения флуорофора, повышения избирательности накопления флуорофора в зоне ишемического повреждения за счет предварительного его связывания с белками (например, альбумином). Выполнение поставленной задачи возможно благодаря экспериментально обнаруженному авторским коллективом проекта феномену накопления индоцианина зеленого в зоне ишемически-реперфузионного повреждения миокарда.

Ранее выполнялись попытки применения NADH аутофлуоресценции при оценке ишемического-реперфузионного повреждения органов брюшной полости, в частности, кишки, в эксперименте (Roseetal., 2006). Однако они не получили распространения в связи с необходимостью затемнения операционной ненадежностью оценки степени ишемических изменений из-за влияния поглощения крови.

Задачей заявляемого исследования является разработка спектроскопического способа, основанного на измерении с помощью волоконного щупа редокс-отношения NADH/FAD, позволяющего обойти указанные сложности и обеспечить интраоперационное выявление наиболее достоверных прогностических факторов. В проекте будет также разработан метод ИК визуализации с использованием индоцианина зеленого, обеспечивающий определение риска развития несостоятельности аппаратного шва в зависимости от степени выраженности и распространенности нарушений кровоснабжения органа.

Описание научных подходов и методов, используемых для решения поставленных задач

Для получения экспериментального подтверждения возможности интраоперационной ИК-флуоресцентной визуализации повреждения миокарда на различных сроках (90 минут, 24 часа) будут выполняться эксперименты на крысах SPF категории в условиях искусственной вентиляции лёгких. Будет выполняться торакотомия в четвёртом межреберье слева и временная перевязка передней ветви левой коронарной артерии путём затягивания, подведённой под артерию лигатуры на заданное время (30 минут). В одной группе животных внутривенное введение раствора индоцианина (1 мг/кг веса животного) будет выполняться через 90 минут от начала восстановления кровотока по окклюзированной коронарной артерии, а в другой группе животные будут восстановлены после операции, а через 24 часа снова наркотизированы для введения ИЦЗ и оценки накопления ИЦЗ в повреждённом миокарде.

Телевизионная регистрация в свете ИК-флуоресценции при возбуждении излучением в области 780-810 нм и регистрацией в области 820-900 нм будет производиться с помощью исследовательского комплекса, который включает мультиспектральную видеосистему «ICG-score». Она обеспечивает возможность телевизионной визуализации и измерения яркости отдельных структур объекта одновременно в видимой и ближней ИК области спектра. В состав комплекса кроме данной камеры входит также диодный лазер с длиной волны 808 нм, обеспечивающий возбуждение ИК флуоресценции. Лазерное излучение направляется на поверхность изучаемой ткани через волоконный световод. Анализ изображения производится с помощью компьютерной программы, позволяющей видеть на экране монитора объект в двух смежных кадрах – черно-белом и цветном. В черно-белом кадре изображение объекта формируется в свете ИК флуоресценции за счет использования лазерной подсветки, в цветном кадре оно представляется в обычном виде за счет его освещения операционной лампой. Обычное изображение используется для анатомической идентификации областей повышенной ИК флуоресценции. С помощью программных средств в интерактивном режиме выполняется измерение площади поверхности ткани с ишемическим повреждением (S_p) в пределах зоны риска и без повреждения (S_n) с последующим определением индекса ишемического повреждения по формуле: $ИИП = S_p / S_n$.

Для изучения зависимости величины области ИК-флуоресценции индоцианина зелёного от времени возникновения ишемически-реперфузионного повреждения миокарда по окончании эксперимента, через 30 минут от окончания введения ИЦЗ, коронарная артерия будет повторно перевязана и внутривенно будет введено 2,5 мл 2% раствора синего Эванса, для выявления зоны риска, то есть миокарда, который находился в зоне ишемии. Затем сердце будет иссекаться, нарезаться в поперечном направлении и фотографироваться. Затем для определения величины зоны некроза в пределах неокрашенной синькой зоны ишемии, срезы сердца будут инкубироваться 15 минут в 1% растворе ТТХ при 37°C, с последующей регистрацией изображений срезов в видимом

свете и регистрацией интенсивности свечения ИЦЗ в зоне ишемического-реперфузионного повреждения и в окружающем неповреждённом миокарде.

После получения экспериментального образца программно-аппаратного спектроскопического комплекса для оценки степени ишемии тканей путем одновременного измерения NADH и FAD аутофлуоресценции будет разработана методика оценки ранних проявлений ишемии миокарда и головного мозга на основе мониторинга редокс-отношения NADH/FAD.

Экспериментальная часть работы по выявлению предикторов ранней несостоятельности аппаратного шва будет выполняться на карликовых свиньях (мини-пигах) породы Биштрассер массой 20-35 кг. Все операции будут выполнены лапароскопически в условиях искусственной вентиляции лёгких. Выполняемые операции — продольная резекция желудка (бариатрия) либо резекция желудка с лимфодиссекцией D2 (онкология). Все операции будут выполняться по стандартной методике. В ходе операции в одних и тех же точках формируемой культи (желудочной трубки) органа (желудок, кишка) трижды будет проводиться оценка интенсивности флуоресценции и индекса микроциркуляции, а именно — после наложения карбоксипневмоперитонеума, после мобилизации желудка и/или кишки, после наложения анастомоза.

Таким образом будет произведена оценка влияния каждого из этапов на жизнеспособность оперируемых органов. В отдельных сериях экспериментов будет произведено моделирование потенциальных причин несостоятельности аппаратного шва:

- локальные нарушения кровообращения (перевязка мелких сосудов и моделирование гематомы в зоне аппаратного шва);
- избыточное сужение дистальной трети желудочной трубки и желудочно-кишечного анастомоза;
- наложение аппаратного шва несоответствующего размера.

Также оценка интенсивности флуоресценции и индекса микроциркуляции в зоне аппаратного шва будет выполняться во время диагностических повторных операций (1-е, 3-е и 7-е сутки после первой операции).

NADH аутофлуоресценция и микроциркуляция будут оцениваться с помощью многофункционального лазерного диагностического комплекса ЛАКК-М (Лазма, Россия). Для оценки ИК флуоресценции будет производиться введение раствора индоцианина зеленого в дозе 1 мг/кг. ИК флуоресценция будет оцениваться с помощью мультиспектрального диагностического комплекса, совмещенного с видеоэндохирургической лапароскопической стойкой ICG (Карл Шторц, Германия). Перед каждым повторным оперативным вмешательством будет выполняться рентгенологическое исследование с пассажем контрастного вещества для выявления/исключения несостоятельности анастомоза. Ежедневно будет выполняться клинический анализ крови для оценки динамики воспалительных изменений. Зона анастомоза будет иссекаться и направляться на гистологическое исследование.

Клиническая часть работы будет заключаться в оценке интенсивности NADH и ИК флуоресценции и индекса микроциркуляции в зоне аппаратного шва при лапароскопической продольной резекции желудка и резекции желудка с лимфодиссекцией D2 по ранее описанной методике.