

Мустафаев Р.Д., Елисеенко В.И., Тихов Г.В.

## Морфологическое обоснование применения фотодинамической терапии для лечения перитонита

Mustafajev R.D., Yeliseenko V.I., Tikhov G.V.

## Morphological backgrounds for photodynamic therapy in peritonitis

ФГБУ «ГНЦ лазерной медицины ФМБА России», г. Москва

В работе представлены результаты морфологических исследований, выполненных во время изучения эффективности проведения сеансов фотодинамической терапии (ФДТ) при лечении экспериментального острого бактериального перитонита у крыс. Анализ морфологических изменений показал, что в тканях брюшины лабораторных животных основной группы (санация брюшной полости методом ФДТ) происходит резкое уменьшение интенсивности воспалительного процесса, усиление микроциркуляции, активация пролиферации тучных клеток и увеличение количества эозинофильных лейкоцитов, восстановление целостности тканей в отличие от данных по контрольной группе (санация брюшной полости 2% р-ром хлоргексидина). *Ключевые слова: фотодинамическая терапия, экспериментальный перитонит, морфологическое исследование.*

The present work analyzes findings of morphological investigations on the effectiveness of PDT sessions made in experimental acute bacterial peritonitis in rats. Morphological changes have indicated that in the peritoneum of laboratory animals from the studied group ( abdominal cavity sanation with PDT) a sharp decrease in the intensity of inflammatory process takes place. Besides, one can see an increased microcirculation, an activation of mast cell proliferation and an increased level of eosinophil leucocytes as well as restoration of tissue integrity in opposite to the controls ( abdominal cavity sanation with 2% chlorhexidine). *Key words: photodynamic therapy, experimental peritonitis, morphological investigation.*

### Введение

Несмотря на достигнутые успехи хирургии к настоящему времени, вопрос о лечении распространенного гнойного перитонита остается фактически нерешенным и по сей день. Летальность при данном заболевании остается высокой и, по данным различных авторов, колеблется от 18 до 80% [1–3, 6, 8, 13]. Одним из наиболее важных и ответственных этапов при оперативных вмешательствах, выполняемых в условиях перитонита, является адекватная санация брюшной полости. Адекватность и эффективность примененного во время операции метода санации во многом определяет дальнейшую динамику развития патологического процесса и окончательный исход хирургического лечения, а также необходимость применения последующих санационных мер [1, 10, 15].

Развитие ФДТ и успешное внедрение данной методики в клиническую практику лечения воспалительных процессов разной локализации [9, 14] и обнаружение к настоящему моменту антибактериального действия ФДТ [8] позволяет, с нашей точки зрения, осуществить попытку изучения возможности применения ФДТ для лечения распространенного перитонита.

### Цель работы

Изучить и описать динамику морфологических изменений, развивающихся в брюшине у лабораторных животных (крыс) с острым перитонитом после проведения сеансов ФДТ. Морфологические исследования осуществляли в рамках комплексного экспериментального исследования, которое включало проведение ви-

зуального осмотра, изучение инструментальных проб и микробиологического контроля.

### Материалы и методы исследования

В работе были использованы 65 крыс-самцов линии Вистар массой тела 200–250 г. Для создания модели острого распространенного калового перитонита мы воспользовались модифицированной методикой В.А. Лазаренко и соавт. [5], основанной на использовании профильтрованной 10% каловой взвеси в дозе 0,5 мл на 100 г. После введения каловой взвеси в брюшную полость подопытным крысам, у животных на 3-и сутки развивалась клиническая картина острого перитонита, выражающаяся в вялости и малоподвижности животных, вздутии живота, отказе от пищи и отсутствии стула. На 3-и сутки животных во всех группах в условиях общей внутривенной анестезии (тиопентал-натрия: 5–7 мг 2% р-ра на 100 г массы тела) подвергали оперативному вмешательству – лапаротомии и санации брюшной полости.

Для оценки эффективности лечения острого разлитого перитонита животные были поделены на 2 группы. В основной группе санацию брюшной полости после лапаротомии проводили методом ФДТ, в контрольной – 2% р-ром хлоргексидина.

В опытной группе животным внутривенно вводили фотосенсибилизатор «Фотодитазин» в дозе 0,8 мг/кг за 120–150 мин до лапаротомии. «Фотодитазин» – производное хлорина Е-6 («Вета Гранд», Россия). В качестве источника света для проведения сеанса ФДТ использовали лазер «АТКУС-2» (Санкт-Петербург, Россия) с выходной мощностью от 1 до 2 Вт, длиной волны 670 нм в непрерывном режиме красного оптического диапазона. Плотность энергии при проведении сеанса лазерного облучения составляла 20–25 Дж/см<sup>2</sup>, при плотности мощности 2 Вт/см<sup>2</sup> и экспозиции 10–12 с.

В контрольной группе санацию брюшины после оценки состояния брюшной полости и распространенности воспалительного процесса осуществляли 2% раствором хлоргексидина до «чистых» вод. Брюшную стенку зашивали через все слои шелком, животное маркировали и помещали в стандартные условия вивария.

Кроме того, в течение 3 суток в послеоперационном периоде в обеих группах проводили антибактериальную терапию (инъекции гентамицина в дозе 2 мг/кг массы внутримышечно).

Морфологические исследования брюшины проводили на 1-е, 3-и, 5-е, 7-е сутки после начала лечения. Биопсийный материал фиксировали в жидкости Карнуа в течение 2 ч и заливали в парафин. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону на коллагеновые волокна, фукселином на эластические волокна, импрегнировали серебром по Гомори для выявления аргирофильных структур. Использовали также гистохимические методы: окраска толудиновым синим для выявления глюкозаминогликанов и их комплексов с белками (протеогликаны), ШИК-реакцию для выявления гликогена и гликопротеинов, реакцию Браше для выявления РНК и реакцию Фельгена для выявления ДНК в клетках.

### Результаты исследования

На 3-и сутки после введения каловой взвеси у животных с острым каловым перитонитом наблюдались симптомы, характерные для перитонита: вялость, заторможенность, взъерошенность шерсти, учащение дыхания, одышка, отказ от еды, жидкий стул и вздутие живота. Крысы концентрировались в одном из углов клетки. При вскрытии брюшной полости, как правило, обнаруживали от 2 до 5 мл воспалительного экссудата серозного или гнойного характера, иногда с геморрагическим компонентом. Брюшина была тусклой, гиперемированной, с гнойно-фибринозными наложениями на поверхности и висцеральной поверхности печени. На органах брюшной полости рыхлые фибриновые спайки в виде «паутишки». На брыжейке кишечника мы отмечали наличие отдельных мелкоочаговых кровоизлияний. Петли кишок раздуты, заполнены массами темного цвета, в некоторых местах кишка отечна, сосудистый рисунок кишечной стенки усилен.

При гистологическом исследовании выявлялась картина фибринозно-гнойного перитонита с выраженной нейтрофильной инфильтрацией, отеком и полнокровием стромы (рис. 1).

Через сутки после оперативного вмешательства в основной группе, где санацию брюшной полости проводили методом ФДТ, животные дышат тяжело, «чихают», малоподвижны, шерсть взъерошена, почти не едят, обильно пьют воду. У крыс сохраняются признаки пареза желудочно-кишечного тракта: вздутие или спазм желудка, спазм отдельных сегментов тонкой кишки, легкое набухание лимфоидных бляшек и брыжеечных лимфатических узлов. Parietalная и висцеральная брюшина инъецирована, несколько тусклая. В брюшной полости имелся слегка мутный экссудат с желтоватым окрашиванием, без запаха. Объем его составлял до 1 мл у 4 из 6 животных, а у остальных – 2–3 мл. Ни в одном случае не было обнаружено признаков термического повреждения брюшины.

Гистологическая картина брюшины характеризовалась значительным уменьшением интенсивности экссу-

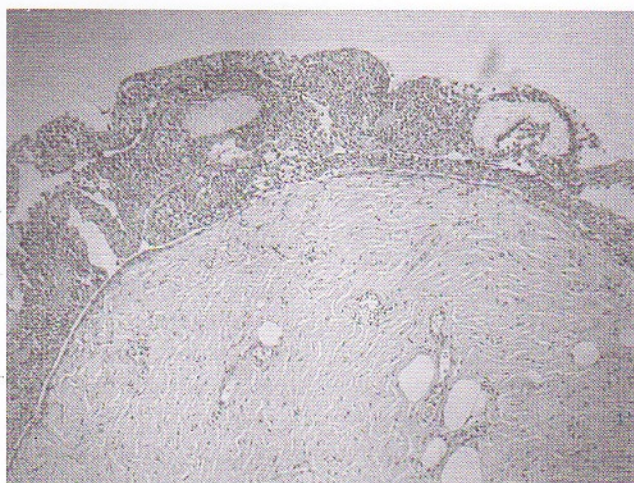


Рис. 1. Фибринозно-гнойный перитонит с выраженной нейтрофильной инфильтрацией, отеком и полнокровием стромы. Окр. гематоксилом и эозином. × 100

дательного воспаления, активацией клеточных элементов системы мононуклеарных фагоцитов (макрофагов) с сохранением венозного полнокровия (рис. 2).

Через 3 суток после лапаротомии и санации брюшной полости животные активные, аппетит нормальный, признаков пареза кишечника нет, при этом мы отмечали сохранение равномерной слабовыраженной гиперемии брюшины с появлением обычного блеска последней. Объем экссудата прозрачного вида уменьшился до 0,5 мл у 2 из 6 животных, у остальных 4 животных менее 0,5 мл. Спаек между петлями брюшины мы не наблюдали, также как и признаков термического поражения брюшины. На препарате интенсивность дисциркуляторных изменений в виде венозного полнокровия и отека стромы значительно снижается (рис. 3), нейтрофильная инфильтрация отсутствует, сохраняется активность клеточных элементов макрофагального ряда, отмечается увеличение количества тучных клеток.

Через 5 суток после операции поведение животных не отличается от здоровых особей. Парез полностью разрешился, исчезла гиперемия брюшины, которая приобрела гладкий, блестящий вид. В брюшной полости имелись единичные рыхлые спайки, более выраженные в области послеоперационной раны, выпота отмечено не было.

При гистологическом исследовании в строме выявляется очаговая метахромазия межтучного вещества, свидетельствующая об активном синтезе гликозамингликанов (рис. 4).

На 7-е сутки у отдельных животных (крыс) выявляются единичные нежные, невыраженные спайки сальника с висцеральной поверхностью печени или петлями тонкой кишки и нижним полюсом селезенки, легко отделяемые, у остальных крыс спаечный процесс не наблюдался. Брюшина гладкая, блестящая.

Вид и морфологическая картина брюшины на 7-е сутки не отличались от брюшины здоровых животных (рис. 5).

В контрольной группе животных, где санацию брюшины проводили 2% р-ром хлоргексидина, в первые сутки отмечалась выраженная одышка, малоподвижность, животные сбивались в одном углу клетки, не ели, обильно пили воду. В брюшной полости обнаруживается около 2–3 мл мутного выпота, в 2 случаях с геморрагическим компонентом. На висцеральной поверхности печени, между брюшинными листками серповидной складки и в складках сальника были определены единичные вкрапления фибрина. Желудок вздут и наполнен содержимым. Отмечалось сегментарное вздутие и атония тонкой кишки, подвздошная кишка спавшаяся, стенки ее отечны.

На 3-и сутки у крыс появляется аппетит, но едят мало. В брюшной полости сохраняется выпот до 1,5 мл, без запаха. Обнаруживаются небольшие межпетельные спайки, а также спайки с передней брюшной стенкой, более выраженные в области послеоперационной раны, или с краями печени и нижнего полюса селезенки, с большим сальником. Брюшина тусклая, инъецирована, сохраняются признаки пареза кишечника, с тенденцией к разрешению.

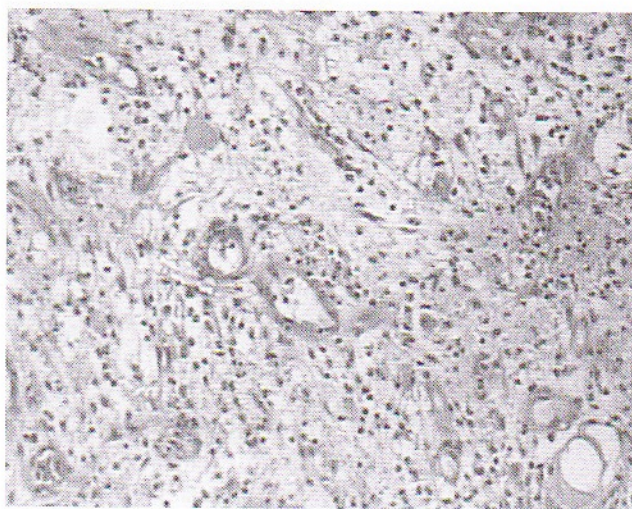


Рис. 2. Брюшина через 1 сут после проведения ФДТ. Значительное уменьшение интенсивности нейтрофильной инфильтрации, активация клеточных элементов системы мононуклеарных фагоцитов (макрофагов) с сохранением венозного полнокровия. Окр. гематоксилином и эозином.  $\times 120$

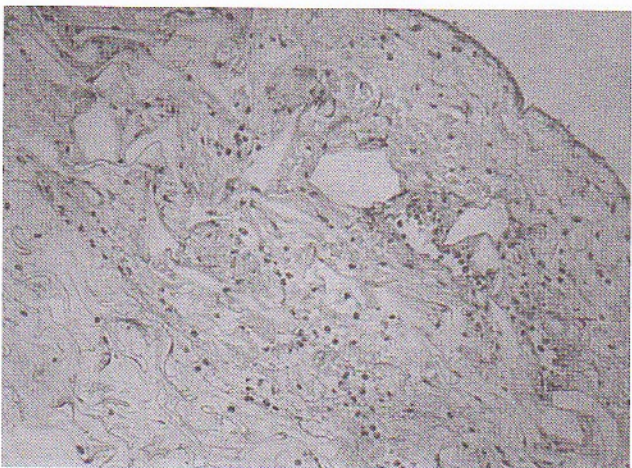


Рис. 3. Брюшина через 3 сут после проведения ФДТ. Венозное полнокровие, активация клеточных элементов макрофагального ряда, отсутствие нейтрофильной инфильтрации, увеличение количества тучных клеток. Окр. гематоксилином и эозином.  $\times 180$

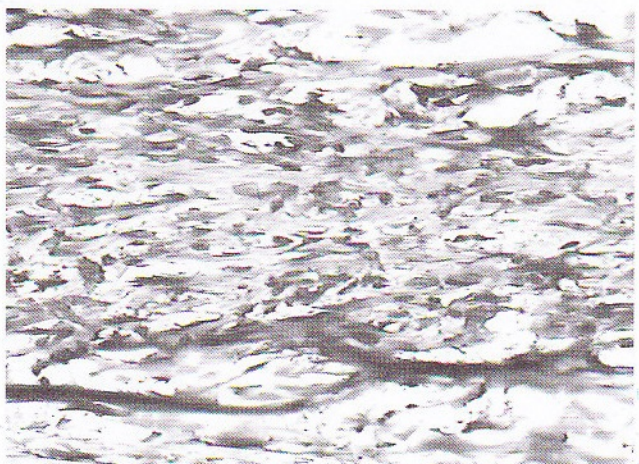


Рис. 4. Брюшина через 5 сут после проведения ФДТ. Очаговая метахромазия межтучного вещества. Дегрануляция тучных клеток. Окр. толуидиновым синим.  $\times 180$

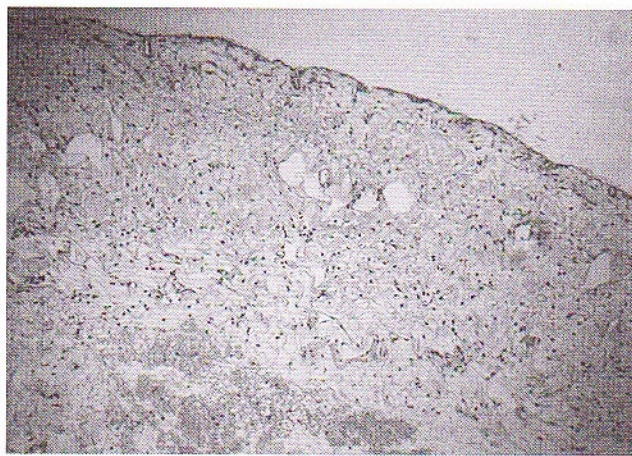


Рис. 5. Брюшина через 7 сут после проведения ФДТ. Отсутствие признаков воспаления, неравномерное венозное полнокровие. Окр. гематоксилином и эозином.  $\times 100$

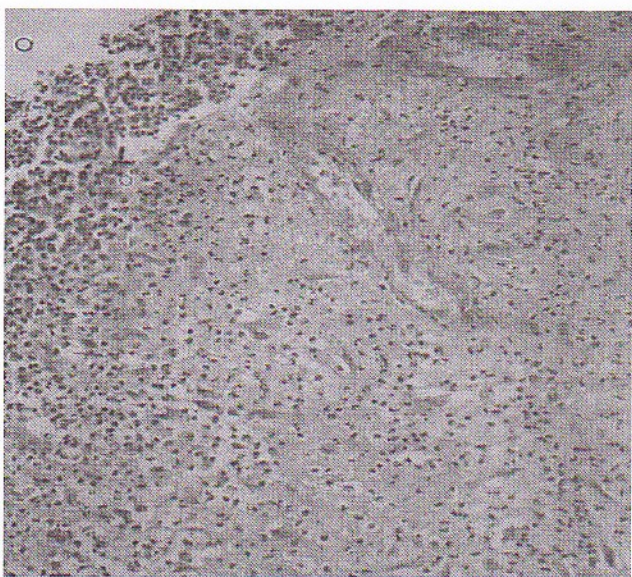


Рис. 6. Стандартный метод лечения. Брюшина через 5 сут. Фибринозно-гнойный перитонит. Венозное полнокровие, отек брюшины, фибринозно-гнойный экссудат на поверхности, нейтрофильная инфильтрация стромы. Окр. гематоксилином и эозином.  $\times 120$

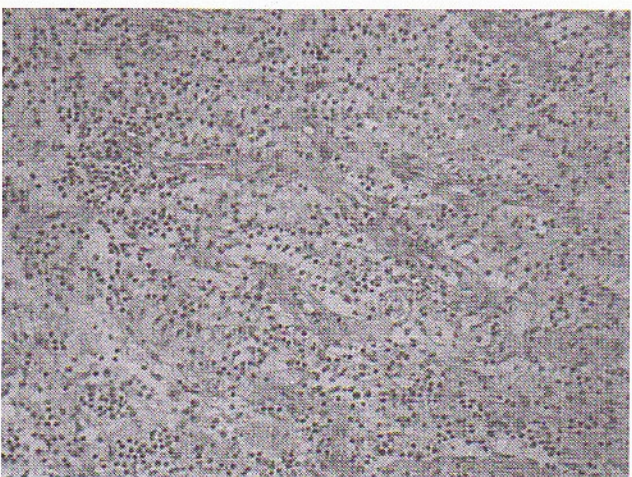


Рис. 7. Стандартный метод лечения. Брюшина через 7 сут. Гнойный перитонит. Отек, выраженная нейтрофильная инфильтрация стромы. Окр. гематоксилином и эозином.  $\times 120$

На 5-е сутки в брюшной полости около 0,5–1 мл светлого выпота, отмечается гиперемия брюшины, межпетельные, а также шнуровые спайки. Парез кишечника разрешен. Отмечается тенденция к локализации воспалительного процесса, ограничивающегося областью операционной раны. При гистологическом исследовании выявляется значительное уменьшение фибринозного компонента воспаления на поверхности раны с сохранением отека и венозного полнокровия стромы висцеральной и париетальной брюшины, уменьшением интенсивности нейтрофильной инфильтрации (рис. 6).

К 7-м суткам в брюшной полости незначительное количество выпота светлой окраски определено у 2 особей. Сохраняется слабовыраженная гиперемия брюшины, появление свойственного ей блеска. При гистологическом исследовании сохраняется тенденция к уменьшению интенсивности нейтрофильной инфильтрации, отека и полнокровия стромы (рис. 7).

Макроскопическая картина брюшной полости у крыс после сеанса ФДТ в основной группе на всех этапах исследования была существенно лучшей, чем в контрольной группе.

### Выводы

Анализ результатов морфологических исследований у экспериментальных животных с острым перитонитом убедительно свидетельствует о высокой эффективности проведения ФДТ для санации брюшной полости в сравнении с использованием 2% антисептического раствора хлоргексидина, что является важным вкладом в совершенствование методов лечения острого перитонита. Простота способа, его доступность, надежность, исключение термического повреждения брюшины дают, по нашему глубокому убеждению, основание к дальнейшему изучению возможности высвращения метода ФДТ для лечения острого распространенного перитонита в клинике.

### Литература

1. Афеендулов С.А., Бежежанов Б.А. Опибки в лечении травматического перитонита // Первый Московский международный конгресс хирургов. М. 2003. С. 103–104.
2. Гельфанд Б.Р., Гологорский В.А., Бурневич С.З., Гельфанд Е.В. Антибактериальная терапия хирургической абдоминальной инфекции и абдоминального сепсиса // *Consilium medicum*. 2000. Т. 2. № 9. С. 374–379.
3. Гостищев В.К., Сажин В.П., Авдovenko А.Л. Перитонит. М.: Геотар-мед, 2002. 238 с.
4. Кригер А.Г., Шуркалин Б.К., Горский В.А., Фаллер А.П., Андрейцев И.Л., Глушков П.С., Майорова Е.В. Результаты и перспективы лечения распространенных форм перитонита // *Хирургия*. 2001. № 8. С. 8–12.
5. Лазаренко А.В., Липатов В.А., Блинков Ю.Ю., Скориков Д.В. Экспериментальная модель распространенного калового перитонита // *Курск. науч.-практ. вестн. «Человек и его здоровье»*. 2008. № 4. С. 128–132.
6. Костюченко К.В. Современные аспекты хирургического лечения распространенного перитонита // *Акт. вопр. хирург.* Ярославль, 2003. С. 215–223.
7. Савельев В.С., Филлимонов М.И., Подачин П.В., Бурневич С.З., Юсуфов С.Г. Выбор лечебной тактики при распространенном перитоните // *Апп. хирургии*. 1998. № 6. С. 32–36.
8. Странадко Е.Ф., Кулешов И.Ю., Караханов Г.И. Фотодинамическое воздействие на патогенные микроорганизмы