

Гейниц А.В., Мустафаев Р.Д., Тихов Г.В., Кизевадзе Р.И.

Фотодинамическая терапия в лечении перитонита (экспериментальное исследование)

Geynitz A.V., Mustafajev R.D., Tikhov G.V., Kizevadze R.I.

Photodynamic therapy in treating peritonitis (experimental study)

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

На модели острого бактериального перитонита у 168 крыс-самцов (линия Вистар) проведены экспериментальные исследования. Изучены особенности накопления фотосенсибилизатора в париетальной брюшине и эффективность фотодинамической терапии (ФДТ) при лечении бактериального распространенного перитонита в эксперименте. Для проведения ФДТ использовали лазер «Аткус-2» (Россия) с выходной мощностью от 1–2 Вт, длиной волны 670 нм. Методом флуоресцентной спектроскопии выявлено, что максимальное время накопления препарата фотодитазин составляет 2–2,5 ч. По данным спектрографии после проведения лазерного воздействия, интенсивность флуоресценции снизилась на 76,6%, что свидетельствует об активности фотодинамической реакции. Анализ результатов данных клинического течения, лабораторных, микробиологических методов исследования и летальности свидетельствует о преимуществе санации брюшной полости методом ФДТ по сравнению с традиционными методами санации при экспериментальном перитоните. Ключевые слова: распространенный перитонит, фотодинамическая терапия, фотодитазин.

Studies on the effectiveness of photodynamic therapy (PDT) have been made in 168 laboratory animals (Wistar line) with bacterial peritonitis. Peculiarities of photosensitizer's accumulation in the parietal peritoneum and PDT effectiveness in extended bacterial peritonitis have been studied in this work. Laser «ATKUS-2» (Russia) with output power 1–2 Wt and wavelength 607 nm was used. Fluorescent spectroscopy has revealed that the maximal accumulation time of photosensitizer photoditazin is within 2–2.5h time interval. Spectrography findings have shown that after laser irradiation fluorescent intensity have decreased by 76.6% thus, indicating PDT active reaction. Laboratory data and clinical picture as well as findings of microbiological methods and mortality rate show that PDT sanation of the abdominal cavity is more effective than conventional sanation in experimental peritonitis. Key words: extended peritonitis, photodynamic therapy, photoditazin.

Введение

Лечение острого распространенного перитонита до настоящего времени остаётся одной из актуальнейших проблем абдоминальной хирургии, что подтверждается высокими цифрами летальности, составляющими, по данным разных авторов, от 18 до 60% [1, 4, 6, 8]. Одним из составных и наиболее важных элементов комплексного лечения распространенного перитонита является устранение причины развития перитонита и эффективная санация брюшной полости.

К настоящему времени предложено множество различных методов обработки брюшины, основанных на использовании ультразвуковых технологий, гидропрессивных обработок, лазерного облучения, озонотерапии, электроимпульсного воздействия и др. Вышеуказанные методы, безусловно, значительно повысили эффективность лечения рассматриваемой патологии, однако ряд вопросов, касающихся санации брюшной полости и снижения уровня бактериального обсеменения брюшины, остается до настоящего времени не решенным до конца. Это, с одной стороны, обусловлено тем, что в ряде случаев не представляется возможным во время однократной интраоперационной санации полностью удалить патогенную микрофлору, с другой – купировать гнойно-воспалительный процесс в брюшной полости.

Широкое развитие в последние десятилетия фотодинамической терапии (ФДТ) и успешное внедрение методики в клиническую практику лечения доброкачественных и злокачественных новообразований, воспалительных процессов разной локализации [5, 7, 9–11] и обна-

руженнное бактерицидное действие ФДТ [3] позволяет, с нашей точки зрения, применить метод ФДТ для лечения распространенного перитонита в эксперименте.

Цель работы

1. Изучение особенностей накопления фотосенсибилизатора в воспаленной брюшине у крыс при экспериментальном распространенном перитоните.
2. Изучение эффективности применения ФДТ при лечении экспериментального распространенного перитонита.
3. Изучение антибактериальных свойства ФДТ при экспериментальном перитоните.

Материалы и методы исследования

В работе были использованы 168 крыс-самцов линии Вистар массой тела 200–250 г. Для создания модели острого распространенного калового перитонита нами применена модифицированная методика Лазаренко В.А. и соавт. [2] с использованием профильтрованной 10% каловой взвеси в дозе 0,5 мл на 100 г. После введения каловой взвеси в брюшную полость у животных на 3-и сутки развивалась клиническая картина острого перитонита, выражаясь в язвости и малоподвижности животных, вздутии живота, отказе от пищи и отсутствии стула. На 3-и сутки животных во всех группах на фоне картины разлитого перитонита подвергали оперативному вмешательству в условиях общей внутривенной анестезии (тиопентал-натрия: 5–7 мг; 2% р-ра на 100 г массы тела). Животным производили лапаротомию и сана-



Рис. 1. Проведение сеанса облучения брюшины крысы с распространенным перитонитом с помощью лазерного аппарата «АТКУС-2» (Россия)

цию брюшной полости. За 30–180 мин до оперативного вмешательства в зависимости от группы животным внутривенно вводили фотосенсибилизатор фотодитазин (производное хлорина e6, фирма «Вета Гранд», Россия) в дозе 0,8 мг/кг массы тела.

При лазерном однократном облучении плотность энергии составляла от 20 до 25 Дж/м², мощность 2 Вт/см², время экспозиции – 10–12 с.

Изучение накопления фотодитазина в брюшине проводили с помощью многоканального оптического волоконного спектроанализатора (ЛЭСА-01-Биоспек, Россия) с определением интенсивности флуоресценции по 12 точкам (рис. 2). Оценивали соотношение интенсивности флуоресценции к так называемой лазерной линии (интенсивность излучения, диффузно отраженного от тканей).

На первом этапе опытов изучали накопление фотосенсибилизатора в воспаленной брюшине при экспериментальном перитоните. Оценивали состояние брюшной полости и распространенность воспалительного процесса, выполняли флуоресцентную спектрографию. Затем проводили санацию брюшной полости стерильным физиологическим раствором до удаления фибрин из брюшной полости. После завершения санации промывную жидкость эвакуировали из брюшной полости электроотсосом и проводили облучение брюшины методом, исключающим термическое повреждение тканей. По окончании облучения через 5 мин выполняли повторную флуоресцентную спектрографию. Брюшную стенку зашивали через все слои шелком, животное маркировали и помещали в стандартные условия вивария.

Экспериментальная работа по изучению накопления фотосенсибилизатора в брюшине выполнена на 64 крысях. Все животные были разделены на 8 групп, из которых 2 были контрольными, а 6 – основными. Каждая группа включала 8 особей: 6 основных групп составляли крысы с распространенным серозно-фибринозным перитонитом, которым вводили фотосенсибилизатор. Эти 6 основных групп различались по моменту проведения спектрографии: на 30, 60, 90, 120, 150 и 180 мин от момента введения фотосенсибилизатора (т. е. разли-



Рис. 2. Проведение спектрально-флуоресцентных измерений на брюшине крысы с распространенным перитонитом с помощью ЛЭСА-01-Биоспек (Россия)

чались по времени распределения и накопления препарата в тканях).

Седьмую контрольную группу составляли крысы, у которых на фоне экспериментально смоделированного распространенного серозно-фибринозного перитонита фотосенсибилизатор не вводили.

В 8-ю контрольную группу вошли интактные крысы, у которых производили определение накопления фотосенсибилизатора при не подверженной воспалению брюшине.

Таким образом, в работе было проведено изучение накопления фотосенсибилизатора фотодитазина в интактной париетальной брюшине при экспериментальном остром разлитом каловом перитоните и оценены результаты ФДТ.

Во время операции (лапаротомии) макроскопически вид брюшины у крыс 7-й контрольной группы и всех основных групп соответствовал картине острого гнойного распространенного перитонита, выражавшейся в наличии в брюшной полости воспалительного экссудата, отложении фибрина на париетальной и висцеральной брюшине, вздутии петель кишечника и выраженному инъецировании сосудов париетальной брюшины.

Оценка эффективности лечения острого разлитого перитонита проведена у 65 животных, которые были разделены на основную и контрольную группы, где санацию брюшины проводили наиболее распространенным в клинической практике способом – промыванием брюшной полости 2% раствором хлоргексидина до «чистых» вод. После оценки состояния брюшной полости и распространенности воспалительного процесса брюшную стенку зашивали через все слои шелком, животное маркировали и помещали в стандартные условия вивария. Кроме того, в течение 3 суток в послеоперационном периоде проводили антибактериальную терапию: инъекции гентамицина из расчета 2 мг/кг массы внутримышечно.

Основная группа состояла из 43 крыс, у которых санацию брюшной полости производили методом ФДТ. Контрольная группа состояла из 22 крыс, у которых для

санации брюшной полости применяли антисептический раствор (2% р-р хлоргексидина).

Эффективность применения ФДТ при лечении острого перитонита оценивали по общему состоянию животных, клиническим проявлениям процесса и количеству летальных случаев в различных экспериментальных группах. Оценивали динамику изменения клинических и биохимических показателей крови животных. Проводили микробиологические исследования воспалительного экссудата из брюшной полости и морфологические исследования париетальной брюшины во всех группах экспериментальных животных.

Кроме указанного, при выполнении работы нами было проведено изучение антибактериальных свойств ФДТ при перитоните, при котором существенное значение имеет определение числа КОЕ микроорганизмов в послеоперационном периоде. Данный фрагмент исследований был осуществлен на 32 крысах. Для более удобного подсчета микроорганизмов в экссудате перитонит вызывали внутрибрюшинным введением монокультуры *E. Coli* (штамм 25922) в концентрации 10^8 микробных тел в 1 мл суспензии из расчета 0,01 мл заражающей дозы на 1 г массы животного. Животных выводили из эксперимента передозировкой анестетика (тиопентала натрия) через 24 ч, 72 ч, на 5-е и 7-е сут после оперативного вмешательства для оценки результатов. Основная группа состояла из 20 крыс, у которых санацию брюшной полости проводили методом ФДТ. Контрольная группа состояла из 12 крыс, у которых санацию брюшной полости проводили 2% раствором хлоргексидина.

Все исследования проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», регламентированными в приложении к Приказу МЗ СССР №775 от 12.09.77 г.

Результаты исследования

В обследованных нами группах животных были получены различные результаты. На рис. 3 приведены кривые спектра флуоресценции, полученные во всех 8 обследованных группах. Кривая 8 показывает результаты, зарегистрированные в контрольной группе (интактные крысы) и демонстрирует колебания показателя флуоресценции в пределах $0-10 \pm 5$ Ед. ф., что отражает отсутствие признаков накопления фотосенсибилизатора в брюшине крысы, не пораженной воспалительным процессом.

Кривая 7 представляет результаты спектрофлуоресценции, полученные у крыс контрольной группы с экспериментальным каловым перитонитом, которым «фотодитазин» в организм не вводили. Поэтому нами в этой группе были получены данные флуоресценции в пределах 400 ± 50 Ед. ф., отражающие спектр флуоресценции бактерий.

Анализ полученных нами спектров флуоресценции по данным 6 основных групп свидетельствует о равномерном накоплении фотодитазина в клетках воспаленной брюшины. При этом максимальный пик накопления приходится на временной интервал 120 мин (3000 ± 155 Ед. ф.) и 150 мин (3200 ± 150 Ед. ф.) при умеренном снижении спектра в последующие часы.

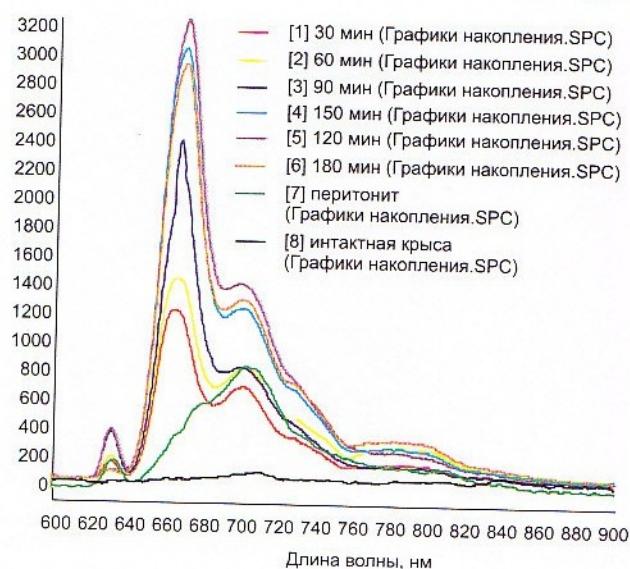


Рис. 3. Спектр флуоресценции (кривые с 1-й по 6-ю – основные группы, кривые 7-я и 8-я – контрольные)

Таким образом, результаты спектрографии свидетельствуют о том, что оптимально эффективный момент для оперативного лечения и лазерного воздействия на брюшину при остром распространенном перитоните у экспериментальных животных развивается через 2–2,5 ч, после введения фотодитазина.

После определения времени максимального накопления фотосенсибилизатора мы производили облучение брюшины крысы лазерным излучением длиной волны 670 нм в непрерывном режиме с выходной мощностью от 1 до 2 Вт. Повторную флуоресцентную спектрографию производили через 5 мин после облучения. Динамика изменения флуоресценции отображена на рис. 4. По полученным результатам можно с уверенностью сказать, что интенсивность флуоресценции препарата при воспаленной париетальной брюшине, соответствующая 3200 ± 150 Ед. ф., после сеансов лазерного облучения брюшины приводила к снижению этого показателя более чем в 4 раза, до уровня 750 ± 70 Ед. ф.

По данным спектрографии, проведение ФДТ приводило к снижению интенсивности флуоресценции в сравнении с исходными данными на 76,6%, что свидетельствует о выраженному возбуждении фотосенсибилизатора, высокой степени фотодинамической реакции и эффективности ФДТ. Полученный факт подтверждает и снижение концентрации препарата в тканях под влиянием лазерного облучения с максимумом длины волны 670 нм.

Таким образом, в результате проведенных исследований методом флуоресцентной спектроскопии нами было обнаружено, что после введения крысам препарата внутривенно в дозе 0,8 мг/кг время, требуемое для максимального накопления фотодитазина в тканях, – составляет 2–2,5 ч. После проведения лазерного воздействия интенсивность флуоресценции снижается на 76,6%, что свидетельствует об эффективности проведения ФДТ и снижении концентрации препаратов в тканях при экспериментальном разлитом перитоните.

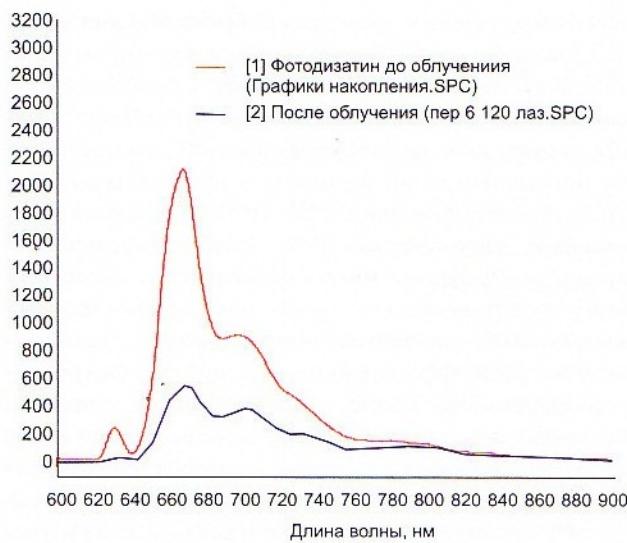


Рис. 4. Спектр флуоресценции фотосенсибилизатора фотодизатин у крыс с распространенным перитонитом до облучения (кривая 1) и после облучения (кривая 2)

Для оценки эффективности лечения острого разлитого перитонита животные были поделены на основную группу, в которой санацию брюшной полости при оперативном вмешательстве проводили методом ФДТ, и контрольную группу, в которой санацию брюшины проводили традиционно 2% р-ром хлоргексидина.

Через сутки после операции в основной группе у крыс сохранялись признаки пареза желудочно-кишечного тракта, воспаление париетальной и висцеральной брюшины. В брюшной полости имелся мутный экссудат с желтоватым окрашиванием, без запаха. Объем его составил 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.

Через 3 суток после оперативного вмешательства парез мы не наблюдали, при этом мы отмечали сохранение равномерной слабовыраженной гиперемии брюшины с появлением обычного блеска последней. Объем экссудата (прозрачного вида) составил 0,5 мл у 2 из 6 животных, у остальных 4 животных менее 0,5 мл. Спаст между петлями кишки и брюшины, как и признаков термического поражения брюшины, мы также не наблюдали.

Через 5 суток после операции парез разрешался, исчезала гиперемия брюшины. Последняя приобретала гладкий, блестящий вид. В брюшной полости имелись единичные рыхлыи спайки, выпота отмечено не было. Аналогичную картину мы наблюдали и на 7-е сутки после лазерной санации, которая макроскопически не отличалась от картины брюшины у здоровых животных.

В контрольной группе животных, у которых санацию брюшины проводили 2% р-ром хлоргексидина, изменения в брюшной полости были существенными прежде всего по объему и характеру экссудата. Динамики в объеме экссудата нами не было отмечено: он составлял 1–3 мл на протяжении всех 7 суток послеоперационного периода, и лишь к концу 7-х суток экссудат становился прозрачным.

У животных в основной группе функция кишечника восстанавливается спустя сутки от начала кормления, а

через 3–4 суток после мер оперативной санации поведение животных не отличалось от такового у здоровых животных, не участвовавших в эксперименте.

В контрольной группе крысы оставались менее активными, слабо реагировали на внешние раздражители, тянулись в основном к поильнику. Функция кишечника у них восстанавливалась на 4–5-е сутки после операции, но даже в эти сроки крысы были вялыми, мало-подвижными.

Летальность в основной группе составила 9,5% (4 крысы), из которых 2 скончались в течение первых 24 часов и 2 в последующие 48 ч вследствие продолжающегося перитонита и нарастающей интоксикации. В контрольной группе летальность составила 27,3% в течение первых 24 часов при явлениях продолжающегося перитонита (6 крыс).

При проведении клинических исследований были получены следующие результаты. Прежде всего было отмечено, что при проведении санации брюшной полости методом ФДТ достоверно более выраженным были признаки купирования синдрома эндогенной интоксикации в сравнении с контрольной группой животных, где санацию производили 2% раствором хлоргексидина. Так, уровень лейкоцитов в основной группе был ниже, чем в контрольной к концу первых суток на 17,1%. На 5-е сутки послеоперационного периода разница содержания лейкоцитов в периферической крови в основной группе у крыс была в пределах нормы, а разница между показателями основной и контрольной групп возросла до 21,48%.

Биохимические показатели крови в обеих группах подопытных животных при развитии острого разлитого перитонита демонстрировали факт снижения содержания общего белка, сохраняющегося на протяжении всего периода наблюдения. В первые сутки наблюдения у подопытных крыс основной и контрольной групп не было существенного различия в уровне содержания белка плазмы крови (9,8%). Однако наиболее выраженную тенденцию к повышению данного показателя мы обнаружили у крыс основной группы – к 7-м суткам, когда его уровень повысился на 8,23% по сравнению с контрольной группой.

Содержание мочевины до момента оперативной санации превышало норму на 78,5%, к концу первых суток после нее в основной группе мы фиксировали тенденцию к снижению рассматриваемого показателя. В контрольной группе содержание мочевины в первые сутки после санации увеличилось на 21,64% в сравнении с основной. В последующем концентрация мочевины в контрольной группе превышала данные основной группы к третьим суткам на 17,37%, к пятим – на 7,83%. В основной группе аналогичные показатели были равны, соответственно, 14,63 и 4,78%. К концу седьмых суток уровень этого показателя у крыс соответствовал норме как в контрольной, так и в основной группах.

Представленные результаты по данному фрагменту исследований в первую очередь свидетельствуют о более быстром купировании воспалительного процесса в брюшной полости у крыс основной группы.

Показатели креатинина в плазме крови до санации брюшной полости превышали норму на 54,23%. К кон-

цу первых суток мы отмечали тенденцию к снижению уровня креатинина у крыс обеих групп, причем в контрольной группе эта тенденция была более выражена на 9,8% по сравнению с данными основной группы.

К третьим и пятым суткам наблюдения, наоборот, более выраженная тенденция к снижению уровня креатинина была отмечена у крыс в основной группе по сравнению с контрольной. В основной группе показатели содержание креатинина плазмы уже к пятым суткам были в пределах нормы.

АсАТ на начало опыта превышала норму в 2,1 раза. К концу первых суток было отмечено, что в контрольной группе имелось превышение активности данного фермента по сравнению с основной группой на 34,12%. К 5-м суткам содержание фермента в контрольной группе превышало норму на 19,63%. В обеих группах активность данного фермента нормализовалась лишь к седьмым суткам послеоперационного периода.

Превышение АлАТ на начало опыта составляло 83,9%. На протяжении всего периода наблюдения мы отметили более выраженное снижение активности данного фермента у крыс основной группы по сравнению с контрольной. К концу первых суток после санации активность АлАТ в контрольной группе была повышена на 54,4%, на пятые сутки – на 11,83%. В основной группе данный показатель превышал норму в исследуемые интервалы времени, соответственно на 24,05; 3,12%. К 7-м суткам концентрация АлАТ у крыс в обеих группах возвращалась к норме.

До проведения санации содержание *E. coli* у животных с острым разлитым перитонитом составляло 10^7 – 10^8 микробных тел в 1 мл экссудата. Через сутки после санации брюшины методом ФДТ у выведенных из эксперимента животных число микробных тел значительно снижалось и составляло 10^2 в 1 мл экссудата, а через 3 суток после операции микрофлоры в брюшной полости мы не выявляли. В контрольной группе животных с острым распространенным перитонитом, у которых санацию брюшины проводили 2% р-ром хлоргексидина, концентрация микробных тел кишечной палочки в 1 мл экссудата составила: через 24 ч после операции – 10^4 ; через 72 ч – 10^3 ; через 5 сут – 10^2 микробных тел в 1 мл экссудата. К 7-м суткам после операции брюшная полость становилась стерильной. Полученные результаты, по нашему мнению, являются свидетельством высокой стерилизующей способности ФДТ при остром экспериментальном перитоните у крыс, вызванном монокультурой кишечной палочки.

Заключение

Результаты экспериментальных исследований по изучению эффективности применения ФДТ при остром экспериментальном перитоните свидетельствуют о том, что максимальное время, требуемое для накопле-

ния фотодигазина в воспаленной брюшине, составляет 2–2,5 часа. По данным спектрографии после проведения лазерного воздействия, интенсивность флуоресценции снижается на 76,6%, что свидетельствует об интенсивности протекающей фотодинамической реакции и снижении концентрации препарата в париетальной брюшине при остром разлитом перитоните. Анализ клинических и биохимических показателей периферической крови, как и данные микробиологических исследований у экспериментальных животных с острым экспериментальным перитонитом, убедительно свидетельствуют о большей эффективности ФДТ при санации брюшной полости в сравнении с традиционными методами, что представляет несомненно новые возможности в деле лечения перитонитов. Простота способа, его доступность, надежность, исключение термического повреждения брюшины дают основание к дальнейшему изучению ФДТ с целью внедрения метода ФДТ для лечения острого распространенного перитонита в современной клинической практике.

Литература

- Гостищев В.К., Сажин В.П., Авдовенко А.Л. Перитонит. М.: «Геотар-мед», 2002. 238 с.
- Лазаренко А.В., Липатов В.А., Блинков Ю.Ю., Скориков Д.В. Экспериментальная модель распространенного калового перитонита // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». 2008. № 4. С. 128–132.
- Лихачева Е.В., Алексеев Ю.В., Гейнц А.В. Применение фотосенсибилизаторов (производных тетрапирролов хлоринового ряда) в сочетании со световыми источниками в спектре их поглощения при амбулаторном лечении ряда ЛОР-заболеваний: Мат. симп. «Лазерные технологии в отоларингологии». Тула, 2007. С. 56–57.
- Савельев В.С., Филлимонов М.И., Подачин П.В. и др. Выбор лечебной тактики при распространенном перитоните // Ап. хирургии. 1998. № 6. С. 32–36.
- Странадко Е.Ф., Толстых П.И., Корабов У.М. Фотодинамическая терапия при гнойных заболеваниях мягких тканей // Хирургия. 2000. № 9. С. 67–70.
- Федоров В.Д., Гостищев В.К. Современные представления о классификации перитонита в системах оценки тяжести состояния больных // Хирургия. 2000. № 4. С. 58–63.
- Цыб А.Ф., М.А. Каплан М.А., Попучев Ю.С., Романенко Ю.С. Фотодинамическая терапия. М.: МИА, 2009. 192 с.
- Шаповалова Н.В., Глухов А.А. Комплексная программа детоксикационных мероприятий при терминальном перитоните с использованием озона и гидропрессивных технологий // Анестезиология и реаниматология. 1998. № 6. С. 56–58.
- Dougherty T.J., Gomer C., Henderson B. et al. Photodynamic therapy [Review] // J. Natl. Cancer Inst. 1998. Vol. 90. № 12. P. 889–905.
- Henderson B.W., Dougherty T.J. How does photodynamic therapy work? // Photochem. Photobiol. 1992. Vol. 55. № 1. P. 45–57.
- Muschter R. Photodynamic therapy: a new approach to prostate cancer // Curt. Urol. Rep. 2003. Vol. 4. № 22. P. 1–8.