

## МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНАВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ПРИ РАСПРОСТРАНЕННОМ ПЕРИТОНИТЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Турсуметов А.А, Сабирматов А.А, Ахмедов А.И.

Ташкентский Педиатрический Медицинский институт

<https://doi.org/10.5281/zenodo.6741617>

**Аннотация.** В статье представлены результаты экспериментальных исследований по изучению воздействия на париетальную и висцеральную брюшину интактных животных и с моделированным распространенным перитонитом на белых беспородных крысах весом 140-180 гр. Установлено, что метиленовая синь в концентрации 0,05% у интактных животных при экспозиции 5 минут вызывает десквамацию и небольшие очаги некроза мезотелиальных клеток, а при перитоните на фоне фотодинамической терапии воздействует благоприятно на репаративные процессы в связи с образованием синглетного кислорода. Гистологическая картина брюшины у крыс после проведения санации брюшной полости методом ФДТ на всех этапах исследования была качественно лучше, чем у представителей группы при санации брюшной полости 0,02% раствором хлоргексидина. Авторы на основании полученных результатов морфологических исследований рекомендуют разработанный метод фотодинамической санации брюшной полости внедрить в клиническую практику.

**Ключевые слова:** метиленовая синь, хлоргексидин, брюшина, перитонит, фотодинамическая терапия, синглетный кислород.

## MORPHOLOGICAL SUBSTANTIATION OF THE EFFECTIVENESS OF PHOTODYNAMIC THERAPY FOR WIDESPREAD PERITONITIS IN THE EXPERIMENT

**Abstract.** The article presents the results of experimental studies to study the effect on the parietal and visceral peritoneum of intact animals and with simulated widespread peritonitis on white outbred rats weighing 140-180 g. It was found that methylene blue at a concentration of 0.05% in intact animals after exposure for 5 minutes causes desquamation and small foci of necrosis of mesothelial cells, and with peritonitis against the background of photodynamic therapy, it has a beneficial effect on reparative processes in connection with the formation of singlet oxygen.

The histological picture of the peritoneum in rats after the sanitation of the abdominal cavity by PDT at all stages of the study was qualitatively better than in the representatives of the group during the sanitation of the abdominal cavity with 0.02% chlorhexidine solution. The authors, on the basis of the results of morphological studies, recommend the developed method of photodynamic sanitation of the abdominal cavity to be introduced into clinical practice.

**Key words:** methylene blue, chlorhexidine, peritoneum, peritonitis, photodynamic therapy, singlet oxygen.

## ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Несмотря на достижения современной медицинской науки, вопросы профилактики, диагностики и лечения перитонита сохраняют свою актуальность. Летальность при остром перитоните варьирует в пределах от 32,4-45,5% до 50-90%. В

этиологии перитонита существенную роль играют различные микроорганизмы. В подавляющем большинстве случаев перитонит является результатом аутоинфекции, носящей, как правило, полимикробный характер.

Известно, что успешный результат лечения разлитого гнойного перитонита лишь на 15-20% зависит от эффективности антибактериальной терапии, а остальные 80% связаны с адекватной хирургической тактикой, в том числе, полноценной санацией брюшной полости. Следует отметить, что вопрос о выборе санирующего раствора остается одним из самых противоречивых, дискуссия о способах интраоперационной санации брюшной полости продолжается до сих пор, а по мнению Гостищева Г целесообразно использовать те растворы, которые можно вводить парентерально. Последние годы в хирургическую практику внедряют метод фотодинамической терапии в связи с бактерицидными свойствами фотосенсибилизаторов, связанными с образованием синглетного кислорода на фоне фотохимических реакций. Появились публикации о применении в качестве фотосенсибилизаторов фотодитиазина, хлорфиллипта, димегина и т.д. Актуальной остается проблема выбора фотосенсибилизатора для ФДТ, а также изучение влияния их при перитоните на ультраструктурные элементы брюшины. Однако работ по изучению воздействия метиленовой сини (МС) на ультраструктуру здоровой брюшины, а при экспериментальном перитоните на воспаленную брюшину мы не встречали.

В связи с этим целью нашего исследования явилось: изучить влияние на ультраструктурные элементы висцеральной и париетальной брюшины метиленовой сини, 0,02% хлоргексидина, светодиодного излучения и фотодинамической терапии в норме и при экспериментальном перитоните.

#### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Эксперименты были разделены в 3 этапа:

- 1) изучить гистологическую структуру висцеральной и париетальной брюшины у здоровых экспериментальных животных;
- 2) изучить воздействие метиленовой сини, хлоргексидина и светодиодного излучения на интактную брюшину в отдельности;
- 3) изучить воздействие 0,02% раствора хлоргексидина и фотодинамической терапии, т.е. светодиодного излучения и метиленовой сини в концентрации 0,05% на брюшину при экспериментальном перитоните в сравнительном аспекте. Для создания модели острого экспериментального распространенного гнойного перитонита мы пользовались методикой Блинкова Ю.Ю. (Патент РФ № 2338265).

В группе животных с экспериментальным перитонитом во время операции брюшную полость осушивали отсосом, затем промывали физиологическим раствором. В брюшную полость шприцем заливали 3 мл 0,05% раствора метиленовой сини и оставляли на 5 минут, затем отсосом раствор удаляли и начинали ФДТ. Лапаротомную рану зашивали через все слои шелком, животные маркировали и помещали в стандартные условия вивария. Животных из эксперимента выводили путем декапитации сразу после введения их в эфирный наркоз.

В качестве источника света для проведения сеанса ФДТ использовали светодиодную установку отечественного производства «ФДУ-1» с выходной мощностью

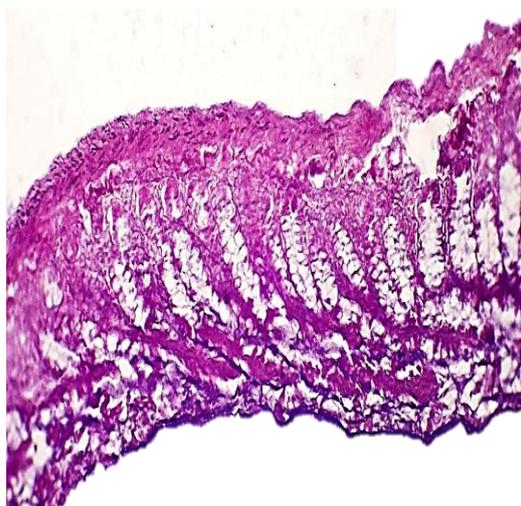
100 мВт/см<sup>2</sup>, длиной волны 630±20 нм в непрерывном режиме красного оптического диапазона. Плотность энергии при проведении сеанса светодиодного облучения составляла 25-35 Дж/см<sup>2</sup>, время экспозиции 3-5 минут.

В контрольной группе санацию брюшной полости осуществляли аналогичным методом как в основной группе, затем в брюшную полость заливали 0,02% раствор хлоргексидина, осушение. Лапаротомную рану зашивали через все слои шелком, животные маркировали и помещали в стандартные условия вивария.

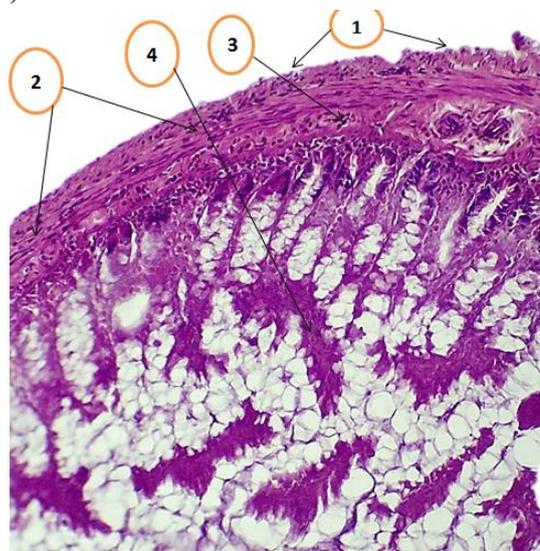
Для изучения ультраструктурные элементы висцеральной и париетальной брюшины забор кишечника с висцеральной брюшиной у крыс осуществляли в области илеоцекального перехода (с висцеральной брюшиной), париетальную брюшину в боковой поверхности живота. Кусочки размерами 0,5-1,0 см тонкой и толстой кишки всех экспериментальных животных фиксировали в 10-12% нейтральном формалине объемом 0,5 см<sup>3</sup>, затем промывали в проточной воде, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, пропитывали ксеролом и заключали в парафин. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином общепринятым методом, закрепляли канадским бальзамом, затем покрывали стеклом. При просмотре и описания микропрепаратов использована электронное бинокулярный микроскоп CYAN. Model DN-300M. С приставкой 34 MP MICROSCOPE Camera, окулярное-объективное увеличение от х=4х10х0,5, х=10х0,25х0,5, х=40х0,65х0,5.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе наших исследований мы изучили ультраструктурное строение париетальной и висцеральной брюшины здоровых беспородных белых крыс. Гистологический висцеральный листок состоит из мезотелиальных клеток (они происходят из однослойного плоского эпителия).



А



Б

**Рисунок 1А.** Нормальная тонкая кишка со всеми слоями. Серозная оболочка, мышечная и слизистая оболочки (с собственной пластинкой). Окраска Г/Э. Увеличение 10X10.

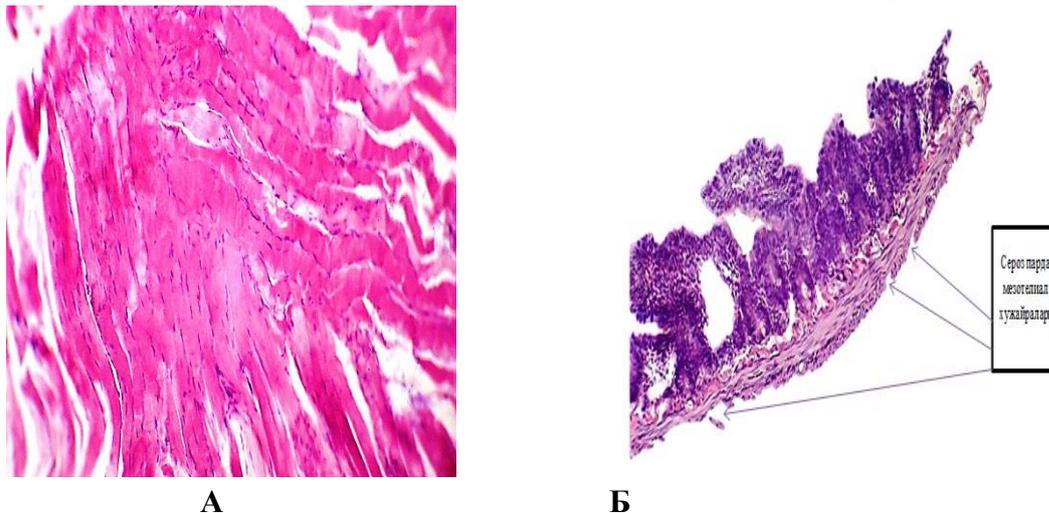
**Рисунок 1Б.** Нормальная тонкая кишка. Мезотелиальные клетки серозного листа (1), мышечная оболочка в продольном и в поперечном направлении (2), собственная

пластика слизистой оболочки (3), ворсинки слизистой оболочки (4). Окраска Г/Э. Увеличение 10X10.

Мезотелиальные клетки вырабатывают секрет – серозную жидкость (синовиальная жидкость). Она обеспечивает свободное скольжение между органами и обеспечивает нормальные перистальтику кишечника. На рисунке 1А представлена тонкая кишка.

На рисунке 1Б представлена нормальная тонкая кишка с мезотелиальными клетками, мышечная оболочка представлена в продольном и поперечном направлении.

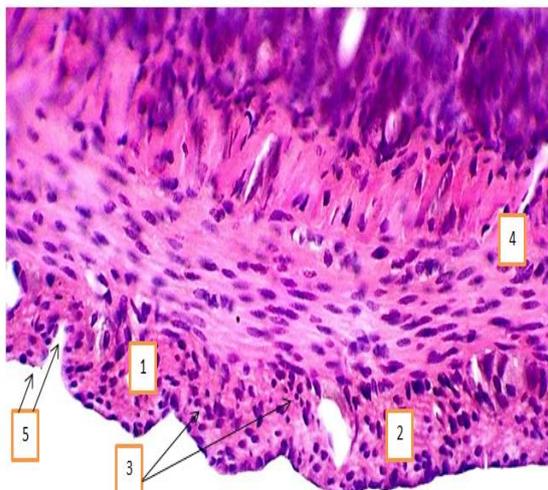
В поперечнополосатой мышце передней брюшной стенки отмечается неравномерный интерстициальный отек мышечных сплетений (рис. 2А).



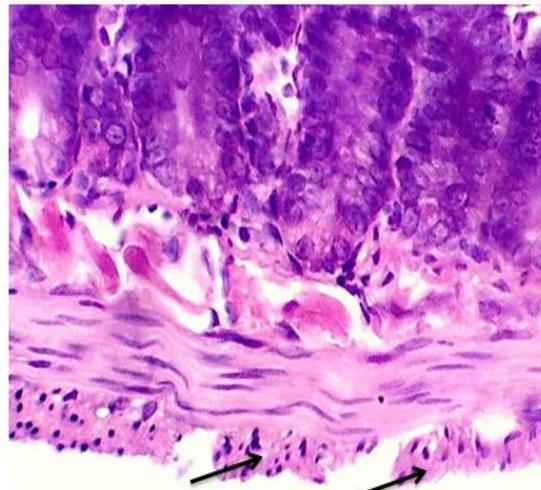
**Рисунок 2А.** Поперечнополосатая мышца передней брюшной стенки. Неравномерный интерстициальный отек мышечных сплетений. Поперечно полосатость мышечных клеток сохранена. Некоторые ядра увеличены. Окраска Г/Э. Увеличение 10X10.

**Рисунок 2Б.** Тонкая кишка. Серозная оболочка разной толщины. Кровеносные сосуды полнокровные. Мезотелиальные клетки серозной оболочки имеют разную текстуру. Десквамация фокальных мезотелиальных клеток. Окраска Г/Э. Увеличение 10X10.

На 2 этапе исследовали воздействие 0,05% раствора МС на здоровую брюшину (висцеральную и париетальную) интактных животных. МС в брюшную полость вводили пункцией живота в ее нижнем этаже шприцем в объеме 3 мл. В связи с тем, что МС в медицине используют как антисептик, а также является оксидантом, она вызывает некоторые изменения на органах и тканях. Так, МС при введении в брюшную полость происходит взаимодействие мукополисахаридами серозной жидкости и способствует образованию кислых глюкозамингликанов. В связи с этим количество мезотелиальных клеток уменьшается, последние относятся к лабильным клеткам (активно размножающиеся). В результате МС начинает оказывать цитостатическое и цитотоксическое воздействие. Эти изменения представлены в рисунках 2Б, 3А.



А

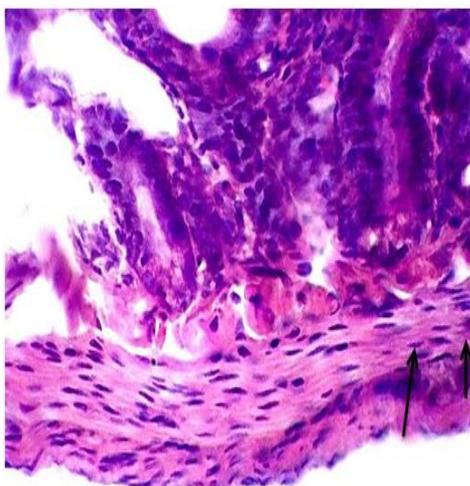


Б

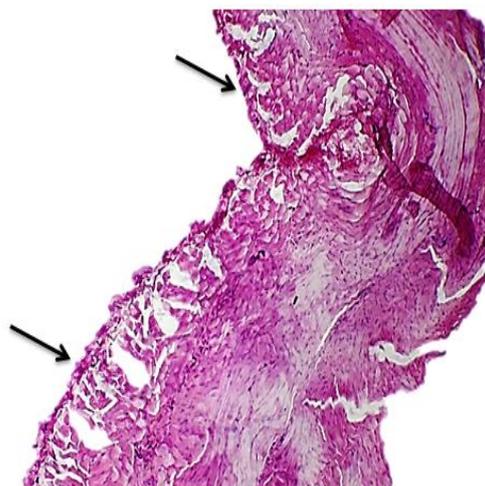
**Рисунок 3А.** Воздействие МС на серозную оболочку тонкой кишки отмечается десквамация и некроз мезотелиальных клеток, дефектных местах наблюдается пролиферация и неравномерное расположение мезотелиальных клеток.

**Рисунок 3Б.** Эрозивно-некротические изменения на серозной оболочке тонкой кишки под воздействием МС. Окраска Г/Э. Увеличение 60X10.

Отмечается множественные восстановительные процессы в очагах десквамации (3Б,4А). Они указаны стрелками. В собственной пластике отмечается неравномерный отек, в пластике соединительной ткани фибриноидное набухание и очаговые фибриноидные некрозы. Окраска Г/Э. Увеличение 40X10.



А

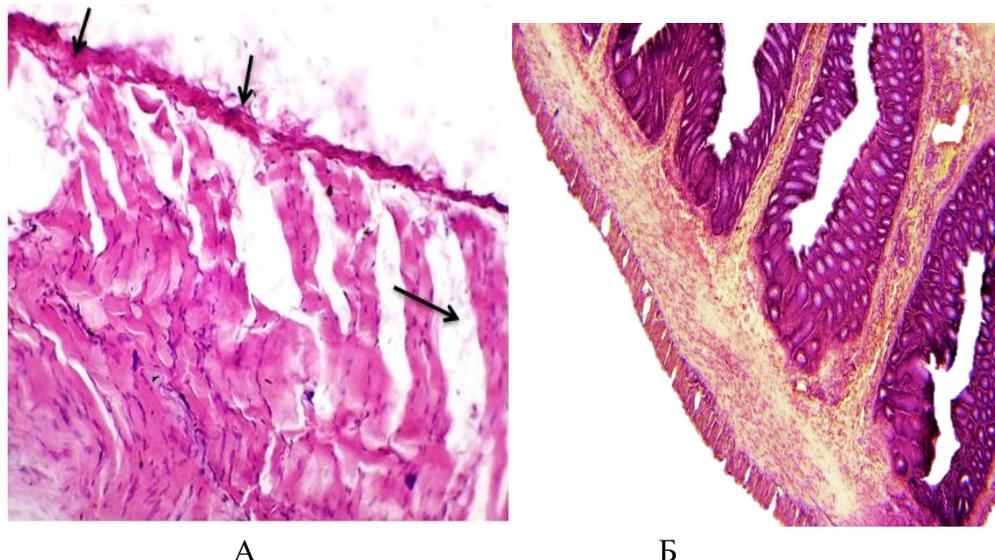


Б

**Рисунок 4А.** В оголенных поверхностях серозной оболочки тонкой кишки под воздействием МС образуются рубцовые поверхности трансформированных фибробластов. Они показаны стрелками.

**Рисунок 4Б.** Поперечнополосатая мышца передней брюшной стенки. На стороне париетальной брюшины имеются множественные очаги фибриноидного некроза. Указаны стрелкой. В поперечнополосатых мышцах наблюдаются дистрофические изменения, поперечность потеряна. Окраска Г/Э. Увеличение 10X10.

В рисунках 4Б - 5А показаны, что МС на париетальной брюшине здоровых животных вызывают фибриноидный некроз, однако ниже будут представлены ультраструктурные изменения у животных с перитонитом, когда МС наоборот усиливает пролиферативные процессы.

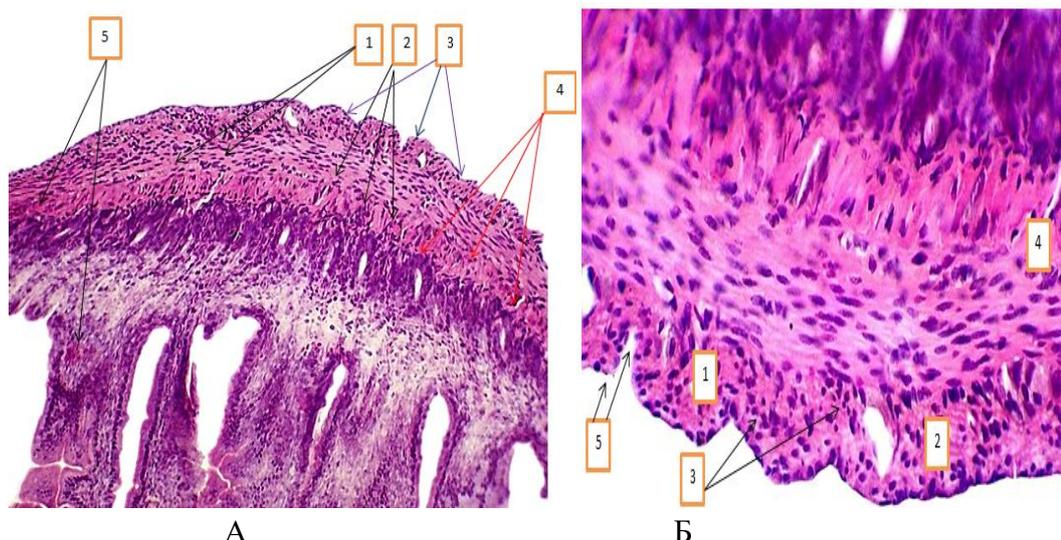


**Рисунок 5А.** В париетальной брюшине (в структурах базального слоя тонковолокнистой соединительной ткани) отмечается фибриноидное набухание, десквамация мезотелиальных клеток, они указаны стрелками, между мышечными пучками имеются разной величины интерстициальный отек, разное окрашивание дистрофический измененной цитоплазмы. Окраска Г/Э. Увеличение 40Х10.

**Рисунок 5Б.** Толстая кишка после воздействия ФДТ с МС. В серозной оболочке множество извилистых и гиперплазированных мезотелиальных клеток (1). Мышечная оболочка одинаковой текстуры, не выраженный интерстициальный отек (2). Слизистая оболочка и ее собственная пластинка полнокровные. В общем фоне гисттиоархитектоника ткани абсолютно не изменена.

Таким образом, у здоровых экспериментальных животных при введении в брюшную полость МС на поверхности серозной оболочки отмечается фокальная или в местах большого скопления МС определяются массивные очаги десквамации. В кровеносных сосудах висцеральной брюшины неравномерное полнокровие, на базальной пластинке оголённые участки, трансформация макрофагов в фибробласты и формирование спаек, в сосудах мышц неравномерное полнокровие, дистрофические изменения в мышцах, в собственной пластинке имеется интерстициальный отек, очаги мукоидного набухания в сосудах неравномерное полнокровие.

**На 3 этапе исследования** изучали морфологические изменения в париетальной и висцеральной брюшине при воздействии ФДТ с МС при экспериментальном перитоните (рис.5Б, 6А).



**Рисунок 6А.** Состояние после ФДТ с МС. На разрезе тонкой кишки. Висцеральная брюшина разной толщины, явно базофильно окрашено. В разной степени интерстициальный отек (1). Капилляры полнокровные (2). Усиленная пролиферация (3) мезотелиальных клетках. Базальная мембрана неравномерной толщины (4). В мышечном слое и в собственной пластинке явное полнокровие (4).

**Рисунок 6Б.** Висцеральная брюшина после воздействия ФДТ с МС. В сосудах висцеральной брюшины полнокровие (1). Интенсивная пролиферация мезотелиальных клетках висцеральной брюшины (2). Группа ещё не сформировавшихся мезотелиальных клеток (3). Полнокровие св собственной пластинке мышечной и слизистой оболочке (4). В связи с пролиферацией поверхность извилистая. Окраска Г/Э. Увеличение 10X10.

Таким образом, под воздействием ФДТ с МС при экспериментальном перитоните выявлены следующие изменения:

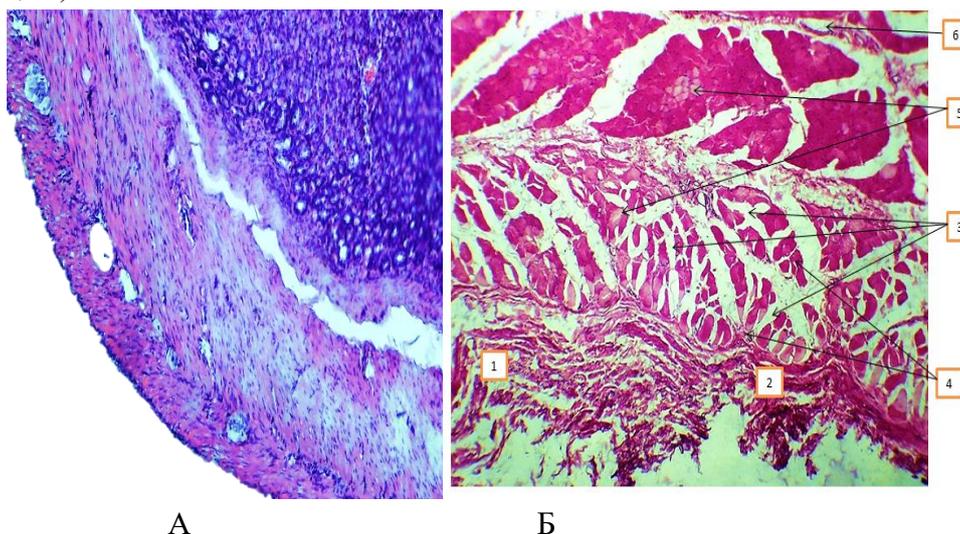
**во – первых**, в связи с выделением синглетного кислорода во время фотохимической реакции может повреждать мембраны любых клеток и вызывать некротический процесс. Если в клетка содержит большое количество митохондрий синглетный кислород вовлекается в цикл Кребса и утилизируется митохондриями. Эти свойства в основном наблюдаются в органах, образованных (паренхиматоз) из эпителиальной клетки. Именно из-за того, что мезотелиальные клетки по происхождению имеют эпителиальную природу повреждаются не значительно и в связи с усилением пролиферативных свойств клетки мезотелиального слоя происходят пролиферативные процессы. Увеличиваются их численность, они бывают многорядными и одноэтажными (рис.6А,6Б);

**во-вторых**, в связи с выходом синглетного кислорода из сенсibilизированной молекулы повреждаются мембран инфекционного агента и в результате этого воспалительный процесс угасает;

**в-третьих** – фибробласты основным компонентом которых соединительная ткань, по происхождению, которые являются мезенхимальными тканями, содержащие малое количество митохондрий их резистентность к воздействию ФДТ и снижением пролиферации пластинка мезотелиальных клеток утолщается (рис.6А);

**в-четвертых**, наблюдается снижение активности воспалительного процесс, в собственной пластинке мышечной и слизистой оболочки отмечается реакция макрофагальной инфильтрации (рис. 6А,6Б). Определяются скопление базофильно окрашенные клетки; в-пятых, экссудативная фаза воспаления угасает, так как под воздействием на поверхности поврежденных тканей усиливаются репаративные процессы (восстановление поврежденных тканей).

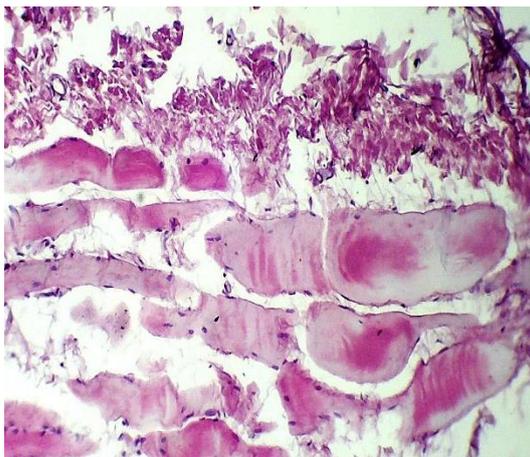
Морфологические изменения в париетальной и висцеральной брюшине после введения в брюшную полость 0,02% раствора хлоргексидина были следующими (рис.7А,7Б):



**Рисунок 7А.** Часть толстой кишки. Серозная оболочка (висцеральный листок) поверхность неровная, извилистого вида (1). Между мышечной оболочкой множество очагов нейтрофильной инфильтрации (2). В собственной пластинке слизистой оболочки отечность (3). В слизистой и подслизистом слоях полнокровие сосудов.

**Рисунок 7Б.** Поперечнополосатая мышца и париетальная брюшина после воздействия 0,02% раствора хлоргексидина. Компоненты париетальной брюшины: деструкция в волоконных структурах, дезорганизация, некроз (1). Полнокровие в сосудах(2). В интерстициуме мышечной ткани неравномерный отек (3), в мышечных сплетениях энди определяются очаги формирующихся очагов фрагментации и декомплексации (4), миоциты фокально хромофобно окрашены (5), в интерстициальных протранствах определяются зоны формирующихся тонко-волокнутой соединительной ткани (6).

Из представленных рисунков 7Б, 8 следует, что 0,02% раствор хлоргексидина у здоровых животных в париетальной брюшине вызывает деструкцию в волоконных структурах, дезорганизацию и некроз. В мышечных сплетениях определяются зоны формирующихся очагов фрагментации и декомплексации. Мышечные сплетения вероятно поражаются в связи с всасыванием хлоргексидина. Следует отметить, что в работе Пустий С.А. было показано о токсическом действии 0,05% раствора хлоргексидина на париетальную и висцеральную брюшину, даже на функциональное состояние печени и селезенки.



**Рисунок 8.** Изменения после воздействия хлоргексидина. Дезорганизация и деструкция компонентов париетальной брюшины. Мышечные сплетения теряют поперечнополосатость. Клетки окрашены хромофобно. Интесциум неравномерно отечный. В интерстициуме формируются тонковолокнистые соединительнотканые соединительная ткань. Ядра миоцитов уменьшены. Определяются очаги лимфоцитарной инфильтрации.

Таким образом, у здоровых экспериментальных животных при введении в брюшную полость МС на поверхности серозной оболочки отмечается фокальная, особенно в местах большого скопления МС определяются массивные очаги десквамации. Между тем при экспериментальном перитоните, т.е. при пораженной брюшине в связи с образованием синглетного кислорода на фоне фотохимической реакции могут повреждаться мембраны клеток, однако если клетка содержит большое количество митохондрий кислород вовлекается в цикл Кребса и утилизируется митохондриями. Эти свойства в основном наблюдаются в органах, образованных из эпителиальной клетки. Мезотелиальные клетки по происхождению имеют эпителиальную природу и содержат большое количество митохондрий и в связи с этим активизируются пролиферативные процессы в клетках мезотелиального слоя. Следовательно, мезотелиальные клетки меньше подвержены повреждениям.

Результаты морфологических исследований наглядно подтверждают различия в результатах интраоперационной санации брюшной полости и лечения экспериментального калового перитонита у крыс при ФДТ с использованием МС в сравнении с группой при санации 0,02% раствором хлоргексидина. Гистологическая картина брюшины у крыс после проведения санации брюшной методом ФДТ на всех этапах исследования была качественно лучше, чем у представителей группы при санации брюшной полости 0,02% раствором хлоргексидина. При этом, дистрофические и деструктивные изменения в мезотелиальном слое, отек и сосудистые нарушения в основной группе менее выражены.

### **ВЫВОДЫ**

Метиленовая синь и светодиодное излучение в красном диапазоне с длиной волны  $630 \pm 20$  нм, с плотностью мощности  $100$  мВт/см<sup>2</sup>, плотностью энергии  $25-35$  Дж/см<sup>2</sup>, длительностью экспозиции  $3-5$  минут в отдельности и в комбинации вызывают десквамацию, полнокровие сосудов висцеральную и париетальную брюшину интактных животных, но мезотелиальные клетки содержат большое количество митохондрий и они

утилизируют синглетный кислород, и в связи с этим повреждения не значительны. Более того в клетках мезотелиального слоя индуцируются пролиферативные процессы.

Водный 0,02% раствор хлоргексидина при введении в брюшную полость животных оказывает повреждающее действие на висцеральную и париетальную брюшину. Это выражается в следующем: деструкция волоконных структур, дезорганизация, некроз, полнокровие в сосудах неравномерный отек в мышечных сплетениях, в сплетениях энди определяются очаги формирующихся очагов фрагментации и декомплексации.

В условиях острого экспериментального распространенного гнойного перитонита фотодинамическая санация брюшной полости метиленовой синью в концентрации 0,05% с светодиодным излучением с длиной волны  $630 \pm 20$  нм, с плотностью мощности  $100 \text{ мВт/см}^2$ , плотностью энергии  $25\text{-}35 \text{ Дж/см}^2$ , длительностью экспозиции 3-5 минут показала, что гистологическая картина брюшины в динамике лучше при ФДТ в сравнении с 0,02% раствором хлоргексидина.

Доступность метиленовой сини, надежность, простота способа, исключение повреждающего действия комбинации фотодинамического воздействия с МС позволяет сделать заключение о возможности внедрения метода фотодинамической санации брюшной полости в клиническую практику.

#### *Использованные литературы*

1. Блинков Ю.Ю. Патогенетическое обоснование способов комплексного лечения распространенного перитонита (экспериментально-клиническое исследование) // Автореф. Дисс. Д.м.н.-2012. -Курск. -С.32.
2. Власов А.П. Новая схема коррекции синдрома эндогенной интоксикации в экстренной хирургии / А.П. Власов, В.А. Болотских, О.В. Маркин и др. // Материалы Общероссийского хирургического форума – 2019 совместно с XXII Съездом общества эндоскопической хирургии России (РОЭХ им. Академика В.Д. Федорова). – Москва, 2019. – С.132 – 133.
3. Гельфанд, Б.Р. Пути оптимизации антимикробной терапии абдоминальных хирургических инфекций в условиях роста антибиотикорезистентности / Б.Р. Гельфанд, Б.З. Белоцерковный, Т.В. Попов // Инфекции в хирургии. – 2015. – Т. 13. – № 2. – С. 36–47.
4. Островская О.Б., Русин В.И., Смотрин С.М. Влияние фотосенсибилизаторов на ультраструктурные элементы брюшины в эксперименте//Новости хирургии. -2011.- Т.19.-№4.-С.3-9.
5. Пустий С.А. Клинико-экспериментальная оценка применения монооксида азота - содержащего газового потока в санации брюшной полости при распространенном гнойном перитоните // Автореферат.дисс. канд.мед наук.-Ставрополь.-2018.-С.27.
6. Русин В.И., Зиматкин С.М., Смотрин С.М. Гистологическая оценка брюшины крыс при экспериментальном перитоните и его лечении с применением фотодинамической терапии // Журнал Гродненского государственного медицинского института. -2011.- №3.-С.21-24.
7. Савельев, В.С. Оценка тяжести поражения органов брюшной полости при перитоните / В.С.Савельев, Б.Р.Гельфанд, М.И. Филимонов // Инфекции в хирургии. – 2013. – №2. – С. 5–9.

8. Kirkpatrick A.W. Closed Or Open after Source Control Laparotomy for Severe Complicated Intra-Abdominal Sepsis (the COOL trial): study protocol for a random-ized controlled trial / A.W. Kirkpatrick, F. Coccolini, L. Ansaloni et al. // World J Emerg Surg. — 2018. — Vol.13. – P. 26.
9. Muller V. The treatment of acute secondary peritonitis: A retrospective analysis of the use of continuous negative pressure therapy / V. Muller, G. Koplin, J. Pratschke et al. // Med Klin Intensivmed Notfmed. — 2018. — Vol.113. – №4. – P. 299 – 304.
10. Virych P.A., Nadтока O.M., Virych P.A., Ku. N.V. Photoinactivation of staphylococcus aureus in vitro by red light (660 nm) in the presense of methylene blue|| Photobiology and experimental photomedicine/ Photobiol Photomed.-28.-2019.-p.66-73.