

УДК 616.381-002-089-091.8-092.9: [615.831:577.344.3]

## ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ БРЮШИНЫ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПЕРИТОНИТЕ И ЕГО ЛЕЧЕНИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

В.И. Русин; С.М. Зиматкин, д.б.н., профессор;

С.М. Смотрин, д.м.н., профессор

Кафедра хирургических болезней №2 с курсом урологии  
УО «Гродненский государственный медицинский университет»

*Целью данного исследования было изучение состояния висцеральной брюшины крыс после моделирования у них экспериментального перитонита и проведения после этого сеанса фотодинамической терапии с использованием фотосенсибилизаторов родамина, кумарина, нильского синего, хлорофиллипта и лазерного излучения красного спектра ( $\lambda = 670$  нм,  $P = 25,5$  мВт/см<sup>2</sup>).*

*Установлено, что при экспериментальном перитоните у крыс применение фотодинамической терапии с растворами фотосенсибилизаторов родамина, кумарина, нильского синего, хлорофиллипта в концентрации 0,1% и лазерным излучением красного спектра ( $\lambda = 670$  нм,  $P = 25,5$  мВт/см<sup>2</sup>) оказывает положительный лечебный эффект на структурные элементы висцеральной брюшины, что говорит о возможности использования в перспективе данных препаратов при лечении воспаления брюшины и органов брюшной полости в лечебной практике медицинских стационаров.*

**Ключевые слова:** фотосенсибилизаторы, лазерное излучение, внутрибрюшинное введение, перитонит.

*The aim of the study was to investigate rat visceral peritoneum state after experimental peritonitis and subsequent conduction of photodynamic therapy session using rhodamine, coumarin, Nile blue, chlorophyllipt photosensitizers and laser radiation of red spectrum ( $\lambda = 670$  nm,  $P = 25.5$  mWt/cm<sup>2</sup>).*

*It was established that the photodynamic therapy using the solutions of rhodamine, coumarin, Nile blue, chlorophyllipt photosensitizers in 0.1 % concentration and laser radiation of red spectrum ( $\lambda = 670$  nm,  $P = 25.5$  mWt/cm<sup>2</sup>) in experimental peritonitis in rats has a positive medical effect on structural elements of visceral peritoneum. It suggests possible prospective use of these preparations in the treatment of peritoneum inflammation and inflammation of abdominal cavity organs in hospital treatment.*

**Key words:** photosensitizers, laser radiation, intraperitoneal introduction, peritonitis.

### Введение

В настоящее время в медицинских учреждениях для лечения заболеваний как хирургического, так и терапевтического профиля всё чаще используется метод фотодинамической терапии [1, 2, 3, 4]. Для повышения её эффективности постоянно осуществляется поиск оптимального сочетания различных фотосенсибилизаторов с лазерным излучением определённых длин волн. Все фотосенсибилизаторы делятся на эндогенные и экзогенные. К первой группе относятся эндогенные порфирины крови [5], вторые часто используются в медицине для лечения различных заболеваний [7, 8, 9, 10, 11]. Возможности использования экзогенных фотосенсибилизаторов изучены далеко не полностью и являются предметом проводимых исследований. Фотодинамическая терапия уже в настоящее время может стать альтернативой традиционным методам и подходам в лечении хирургической патологии, в том числе острого перитонита. Известно, что использование антибактериальных препаратов при остром перитоните не обеспечивает абсолютный успех в его лечении, так как при эмпирически назначенной антибиотикотерапии эффективность её не превышает 60% [6]. В литературе нами не было обнаружено данных об использовании лазерного излучения красного спектра и фотосенсибилизаторов родамин, кумарин, нильский синий, хлорофиллипт в сеансах фотодинамической терапии с целью достижения положительного лечебного эффекта при остром перитоните. Если учесть, что названные фотосенсибилизаторы являются спиртовыми растворами, то изучение гистологической структуры висцеральной брюшины при экспериментальном перитоните является важной частью доклинических исследований.

### Материал и методы

Исследование проведено на 78 беспородных белых крысах массой 150-200 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Оперативные вмешательства были осуществлены в условиях адекватной эфирной анестезии в соответствии с этическими нормами обращения с животными, а также требованиями мирового сообщества «Европейская конвенция по защите позвоночных, используемых для экспериментальных и иных научных целей» (Страсбург, 1986). Все животные были разделены на 13 групп по 6 крыс. В каждой группе (кроме контроля) каловый перитонит моделировался по модифицированному способу Onderdonk (1976). Животным под эфирным наркозом пункционным способом в условиях соблюдения правил асептики и антисептики вводили 2 мл отфильтрованной каловой взвеси не позднее чем через 10 минут после её приготовления. Данную взвесь получали путем смешивания 0,5 мл стерильного изотонического раствора NaCl 0,9% и 0,25 грамма кала интактных животных и фильтрации её через двойной слой марли. Введенное количество каловой взвеси являлось достаточным для развития калового перитонита в послеоперационном периоде. Первая группа (контроль): интактные животные. Всем животным со второй по двенадцатую группы через 4 часа после пункционного введения каловой взвеси производили срединную лапаротомию и проводили санацию брюшной полости физиологическим раствором. Животным тринадцатой группы пункционно вводили 2 мл отфильтрованной каловой взвеси без каких-либо дальнейших вмешательств, то есть моделировали каловый перитонит. Затем крысам второй, третьей, четвёртой, пятой и шестой групп внутрибрюшинно вводили по 2 мл 0,1% раствора этилового спирта, 0,1% спир-

тового раствора родамина, 0,1% спиртового раствора кумарина, 0,1% спиртового раствора нильского синего, 0,1% спиртового раствора хлорофиллипта, соответственно. Животным седьмой группы проводили облучение в течение 15 минут лазерным излучением красного спектра ( $\lambda = 670$  нм,  $P = 25,5$  мВт/см<sup>2</sup>). Крысам восьмой, девятой, десятой и одиннадцатой групп в течение 15 минут проводили сеанс фотодинамической терапии с использованием лазерного излучения красного спектра ( $\lambda = 670$  нм,  $P = 25,5$  мВт/см<sup>2</sup>) и 2 мл 0,1% спиртовых растворов фотосенсибилизаторов родамина, кумарина, нильского синего, хлорофиллипта, соответственно. Операционную рану всем оперированным животным послышно ушивали. Все животные с экспериментальным перитонитом без каких-либо дальнейших вмешательств погибали через 12 часов, а с моделированным перитонитом и последующей санацией физиологическим раствором – через 24 часа. Поэтому крыс этих групп выводили из эксперимента, соответственно, через 12 и 24 часа. Животных всех остальных групп выводили из эксперимента через 48 часов путём декапитации сразу после введения их в эфирный наркоз.

Забор кишечника с висцеральной брюшиной у крыс осуществляли в области илеоцекального перехода. Кусочки тонкой и толстой кишки (с висцеральной брюшиной) всех экспериментальных животных фиксировали в 4% нейтральном формалине, затем промывали в проточной воде, обезжировали в спиртах возрастающей концентрации, пропитывали ксилолом и заключали в парафин. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином общепринятым методом. Полученные гистологические препараты изучали при разных увеличениях микроскопа Axioskop 2 plus (Carl Zeiss) и фотографировали с помощью цифровой видеокамеры Leica DFC320 (Германия).

#### Полученные результаты и их обсуждение

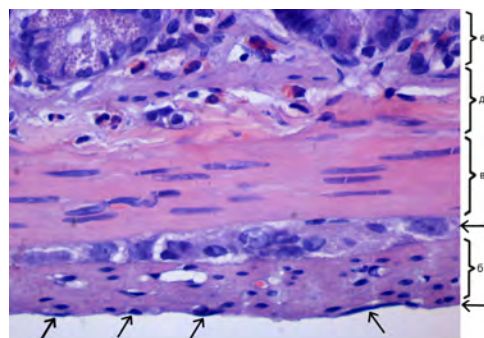
При гистологическом исследовании у интактных крыс брюшина представляет собой тонкий слой рыхлой соединительной ткани, покрытый однослойным плоским эпителием (мезотелием). Последний представляет собой пласт крупных плоских клеток полигональной формы размером 40-50 мкм и толщиной 2-3 мкм. Цитоплазма мезотелиоцитов оксифильна, окрашивается эозином в розовый цвет, ядра – базофильные, окрашиваются гематоксилином в тёмно-фиолетовый цвет. На поперечном разрезе ядра этих клеток выглядят удлинёнными, палочковидными, длиной 10-20 мкм (рис. 1). В норме мезотелий – непрерывный пласт клеток, но он настолько тонкий и ранимый, что при взятии образцов иногда он и у контрольных животных повреждается и местами отслаивается.

После введения в брюшную полость 0,1% раствора этанола серозная оболочка не меняется (рис. 2).

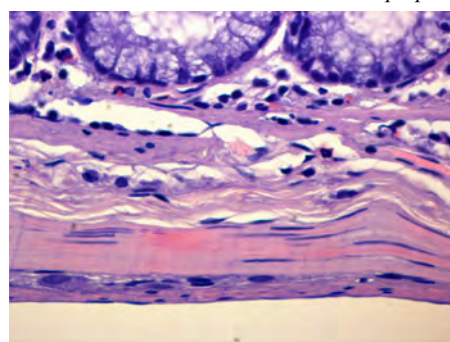
После введения в брюшную полость фотосенсибилизаторов (хлорофиллипта, родамина, кумарина и нильского синего) на 0,1% растворе этанола видимых изменений серозной оболочки у экспериментальных животных не обнаружено (рис. 3-6).

Через 12 часов после моделирования перитонита серозная оболочка у экспериментальных животных выглядит отёчной, с умеренными структурными нарушениями (рис. 7). Вероятно, значительные структурные изменения брюшины не успевают развиваться в связи с быстрой гибелью животных.

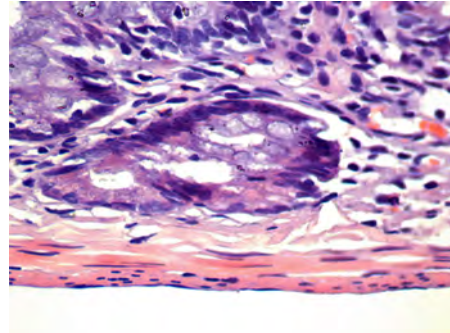
Через 24 часа после моделирования перитонита с последующей санацией брюшной полости физраствором наблюдаются более значительные структурные на-



**Рисунок 1 – Висцеральная брюшина тонкой кишки интактной крысы** а – мезотелий (ядра мезотелиальных клеток показаны стрелками), б – наружный продольный слой мышечной оболочки, в – внутренний циркулярный слой мышечной оболочки, г – ганглий межмышечного нервного сплетения, д – подслизистая основа, е – доньки крипт слизистой оболочки, видны клетки Панета (экзокриноциты с ацидофильными гранулами). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х400. Микрофотография



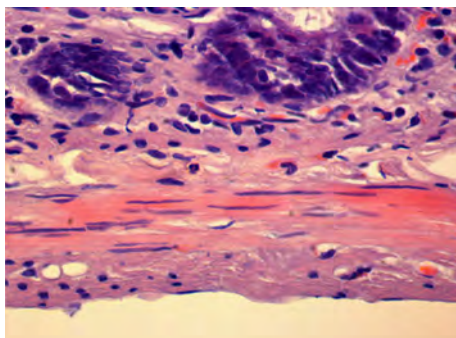
**Рисунок 2 – Висцеральная брюшина кишечника крысы после введения 0,1% раствора этанола.** Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х400. Микрофотография



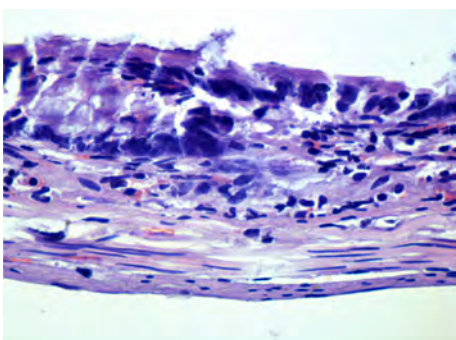
**Рисунок 3 – Висцеральная брюшина кишечника крысы после введения 0,1% раствора хлорофиллипта.** Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х400. Микрофотография

рушения в серозной оболочке крыс, чем у животных без санации (12 часов). В её соединительной ткани развивается отёк, расширяются кровеносные сосуды, происходит набухание клеток мезотелия, набухание или фрагментация их ядер, вплоть до полной гибели клеток. Отмечена очаговая лейкоцитарная инфильтрация серозной оболочки. Наряду с этим происходит значительное, набухание и гибель некоторых гладкомышечных клеток, особенно наружного слоя мышечной оболочки, и нейронов межмышечного нервного сплетения, расширение кровеносных сосудов, венозное полнокровие. Кроме того, наблюдается повреждение и гибель нейронов ганглиев межмышечного нервного сплетения (рис. 8).

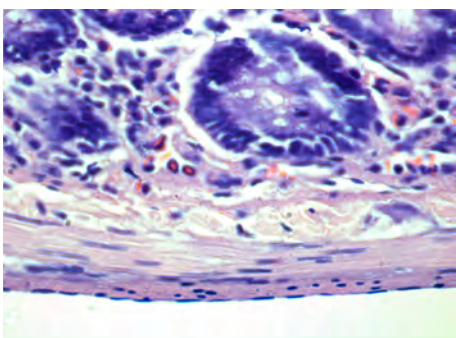
После моделирования перитонита с последующим введением хлорофиллипта и облучение красным лазером через 48 часов в серозной оболочке у экспериментальных животных наблюдаются менее выраженные



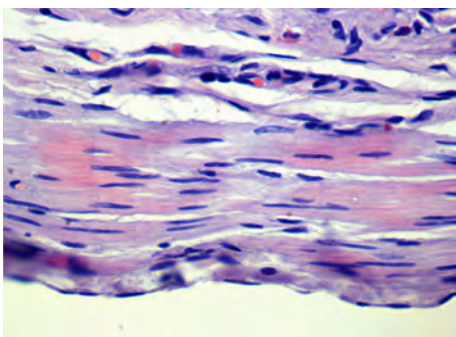
**Рисунок 4** – Висцеральная брюшина кишечника крысы после введения 0,1% раствора родамина. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х400. Микрофотография



**Рисунок 5** – Висцеральная брюшина кишечника крысы после введения 0,1% раствора кумарина. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х400. Микрофотография

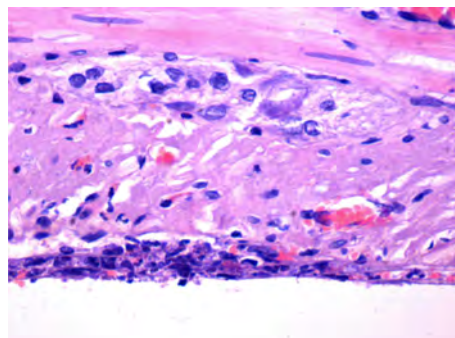


**Рисунок 6** – Висцеральная брюшина кишечника крысы после введения 0,1% раствора нильского синего. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х400. Микрофотография

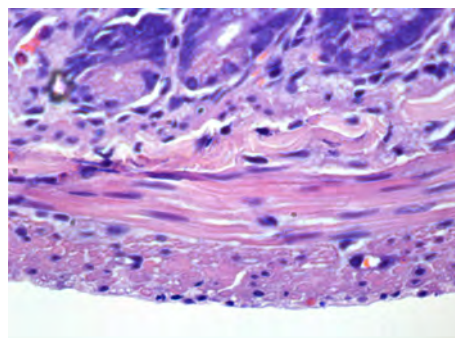


**Рисунок 7** – Висцеральная брюшина кишечника крысы через 12 часов после моделирования перитонита. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х400. Микрофотография

структурные нарушения по сравнению с животными с экспериментальным перитонитом без облучения. Сохраняется набухание мезотелия и повреждение ядер некоторых клеток, однако выраженность воспалительных изме-



**Рисунок 8** – Висцеральная брюшина кишечника крысы через 24 часа после моделирования перитонита с последующей санацией брюшной полости физиологическим раствором. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х400. Микрофотография



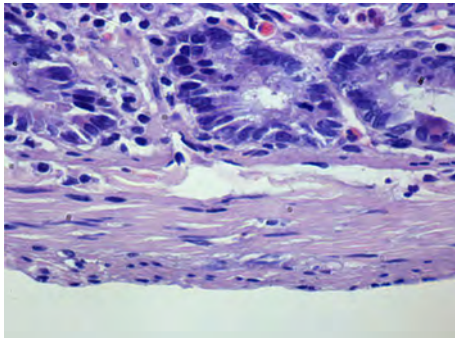
**Рисунок 9** – Висцеральная брюшина кишечника крысы через 48 часов после моделирования перитонита с последующим введением хлорофиллита и облучением красным лазером. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х400. Микрофотография.

нений и повреждение гладкомышечных и нервных клеток гораздо меньше (рис. 9).

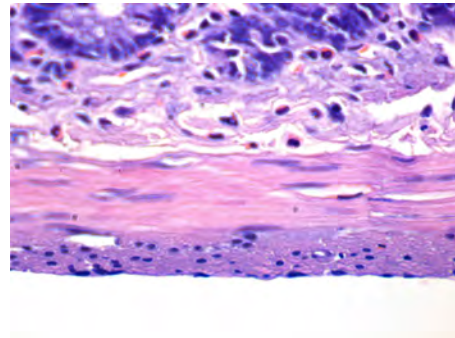
После моделирования перитонита с последующим введением родамина и облучения красным лазером через 48 часов в серозной оболочке у экспериментальных животных также наблюдаются менее выраженные структурные нарушения по сравнению с животными с экспериментальным перитонитом без облучения. Сохраняется набухание мезотелия и повреждение ядер некоторых клеток, однако выраженность воспалительных изменений, а также повреждение гладкомышечных и нервных клеток гораздо меньше, чем без облучения (рис. 10).

После моделирования перитонита с последующим введением нильского синего и облучения красным лазером через 48 часов в серозной оболочке у экспериментальных животных наблюдаются менее выраженные структурные нарушения по сравнению с животными с экспериментальным перитонитом без облучения. Сохраняется отёк серозной оболочки, особенно её соединительнотканного слоя, и повреждение некоторых мезотелиоцитов (их набухание, фрагментация ядер). Выраженность воспалительных изменений, а также повреждение гладкомышечных и нервных клеток гораздо меньше (рис. 11).

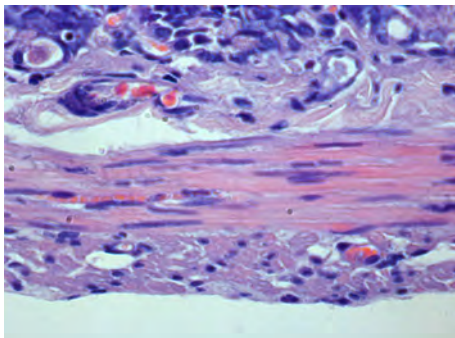
После моделирования перитонита с последующим введением кумарина и облучением красным лазером через 48 часов серозная оболочка также сохраняется лучше, чем при использовании других фотосенсибилизаторов. У экспериментальных животных наблюдаются гораздо менее выраженные структурные изменения по сравнению с животными с экспериментальным перитонитом без облучения. Отёк серозной оболочки (соединительнотканного слоя) и повреждение мезотелиоцитов



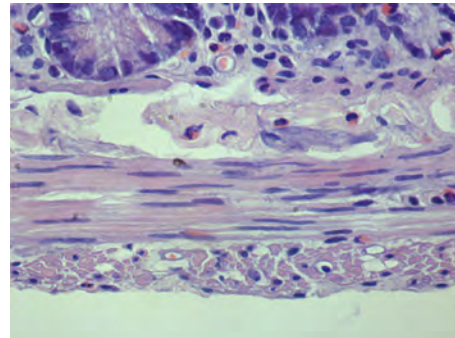
**Рисунок 10** – Висцеральная брюшина кишечника крысы через 48 часов после моделирования перитонита с последующим введением родамина и облучением красным лазером. Окраска гемат оксигином и эозином. Ув. x400. Микрофотография



**Рисунок 12** – Висцеральная брюшина кишечника крысы через 48 часов после моделирования перитонита с последующим введением кумарина и облучением красным лазером. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x400. Микрофотография



**Рисунок 11** – Висцеральная брюшина кишечника крысы через 48 часов после моделирования перитонита с последующим введением метилевого синего и облучением красным лазером. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x400. Микрофотография



**Рисунок 13** – Висцеральная брюшина кишечника крысы через 48 часов после моделирования перитонита с последующим облучением красным лазером. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x400. Микрофотография

выражены незначительно. На гистологических препаратах можно найти участки серозной оболочки, по строению мало отличающиеся от контроля. Воспалительные изменения, а также повреждение гладкомышечных и нервных клеток практически отсутствуют (рис. 12).

После моделирования перитонита с последующим облучением красным лазером через 48 часов серозная оболочка сохраняется лучше, чем при перитоните, но хуже, чем после облучения лазером с использованием фотосенсибилизаторов, особенно кумарина (рис. 13).

### Выводы

1. Этанол и спиртовые растворы фотосенсибилизаторов родамина, кумарина, метилевого синего, хлорофиллипта в концентрации 0,1% при их внутрибрюшинном введении не вызывают видимых изменений элементов висцеральной брюшины крысы.

2. При моделировании калового перитонита в группах животных с санацией брюшной полости физиологическим раствором и без санации в стенке кишечника и особенно в висцеральной брюшине развиваются тяжёлые деструктивные изменения.

3. Фотодинамическая терапия с использованием лазерного излучения красного спектра ( $\lambda = 670 \text{ нм}$ ,  $P = 25,5 \text{ мВт/см}^2$ ) и фотосенсибилизаторов родамина, кумарина, метилевого синего, хлорофиллипта оказывает значительный лечебный эффект, защищая брюшину и другие структуры кишечника от повреждений, развивающихся при экспериментальном каловом перитоните у крысы.

### Литература

1. Баранов, Е.В. Возможности антибактериальной фотодинамической терапии в комплексном лечении пациентов с хроническими язвами венозной этиологии / Е.В. Баранов [и др.] // Современные аспекты лечения декубитальных язв у пациентов со спинальной травмой : сборник научных статей Респ. научно-практ.

конф. с международным участием, Гомель, 25 марта 2011г. / Гом-ГМУ ; редкол.: А.Н. Лыжиков [и др.]. – Гомель, 2011. – С. 5-7.

2. Баранов, Е.В. Экспериментальное обоснование (in vitro) эффективности фотодинамической терапии на типовые и госпитальные штаммы микроорганизмов / Е.В. Баранов [и др.] // Современные аспекты лечения декубитальных язв у пациентов со спинальной травмой: сборник научных статей Респ. научно-практ. конф. с международным участием, Гомель, 25 марта 2011г. / Гом-ГМУ ; редкол.: А.Н. Лыжиков [и др.]. – Гомель, 2011. – С. 3-5.

3. Ишук, А.В. Фотодинамическая терапия: история развития метода и его практическое применение в лечении гнойных ран и трофических язв нижних конечностей Медицинский журнал. – 2007. – № 4. – Режим доступа: [http://www.bsmu.by/index.php?option=com\\_content&task=view&id=85&Itemid=52](http://www.bsmu.by/index.php?option=com_content&task=view&id=85&Itemid=52). – Дата доступа: 15.08.2011.

4. Ишук, А.В. Использование фотодинамической терапии лазерным аппаратом «Родник-1» с фотосенсибилизатором «хлорофиллипт» в лечении гнойных ран и трофических язв нижних конечностей / А.В. Ишук, С.И. Леонович // Новости хирургии. – 2008. – № 1. – С. 44-54.

5. Клебанов, Г.И. Влияние эндогенных фотосенсибилизаторов на лазер-индуцированный прайминг лейкоцитов крови / Клебанов Г.И. [и др.] // Биол. мембраны. – 1998. – Т.15. – №3. – С. 273-285.

6. Курицын, А.Н. Огнестрельный перитонит / А.Н. Курицын, А.К. Раевский. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2007. – 240 с.

7. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник для студентов медицинских институтов / Л.Б. Борисов [и др.]; под ред. Л.Б. Борисова. – М.: ООО «Мед. информ. агентство», 2002. – 736 с.

8. Фотодинамическая терапия злокачественных опухолей основных локализаций с препаратами фотогем и фотосенс (результаты трехлетних наблюдений) / В.В. Соколов [и др.] // Вопросы онкологии. – 1995. – №41. – С. 134-138.

9. Dougherty, T.J. Studies on the structure of porphyrins contained in Photofrin II / T.J. Dougherty // Photochem. Photobiol. – 1987. – Vol. 46 (5). – P. 569.

10. Dougherty, T.J. Use of hematoporphyrin in photodynamic therapy / T.J. Dougherty // Photochem. Photobiol. – 1993. – V. 58. – P. 895-900.

11. The use of porphyrins for eradication of Staphylococcus aureus in burn wound infections / A. Orenstein [et al.] // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 1997. – V. 19(4). – P. 307-314.

Поступила 01.09.2011