

Микробиологическое обоснование эффективности применения фотодинамической терапии в колоректальной хирургии

Гродненский государственный медицинский университет

До настоящего времени одной из основных проблем колоректальной хирургии остается довольно высокая частота несостоятельности толстокишечных анастомозов, приводящей к каловому перитониту. Целью настоящего исследования явилось доказательство эффективности применения фотодинамической терапии для снижения микробного обсеменения зоны анастомоза. Полученные результаты показали, что низкоинтенсивное лазерное излучение в сочетании с фотосенсибилизатором хлорофиллом достоверно снижало рост индикаторных для калового отделяемого микроорганизмов (*Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*). Это свойство может быть использовано в клинике для профилактики калового перитонита после операций на толстой кишке. Ключевые слова: несостоятельность толстокишечного анастомоза, каловый перитонит, фотодинамическая терапия, низкоинтенсивное лазерное излучение, фотосенсибилизатор, хлорофилл.

До настоящего времени одной из основных проблем колоректальной хирургии остается довольно высокая частота несостоятельности швов толстокишечных соустьев. По данным разных авторов, указанное осложнение наблюдается у 1,1-28,5% больных, оперированных на толстой кишке. Тяжелейшие каловые перитониты, развивающиеся на фоне несостоятельности толстокишечных анастомозов, обуславливают высокие цифры летальности (до 50% и выше) [6].

При создании анастомозов полых органов, особенно толстой кишки, всегда имеет место микробное обсеменение из-за чрезвычайно высокой концентрации патогенной и условно патогенной микрофлоры [1]. К настоящему времени многочисленными экспериментальными и клиническими исследованиями доказано, что все межкишечные анастомозы в большей или меньшей степени заживают вторичным натяжением, проходя все стадии репарации гнойной раны. Само наложение ручного шва считается септическим процессом; многорядность швов приводит к ишемии тканей, фитильность и капиллярность лигатур способствует быстрому распространению инфекции из просвета кишки между слоями тканей, в результате чего развивается воспалительный процесс, как в самом анастомозе, так и в свободной брюшной полости [6].

Основной состав микроорганизмов, высеваемых из отделяемого ран, свищей, трещин в колоректальной хирургии и при каловом перитоните представлен в таблице 1 [3].

Таблица 1.

Микроорганизмы, высеваемые при каловом перитоните

Виды микроорганизмов	%
<i>Escherichia coli</i>	31,3
<i>Proteus spp.</i>	3,8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,3
Неферментирующие грамположительные и грамотрицательные бактерии	2,5
<i>Enterococcus faecalis</i>	41,3
Гемолитические стрептококки	7,5
<i>Enterobacter spp.</i>	8,8
<i>Staphylococcus aureus</i>	18,7
Анаэробные грамотрицательные палочки	16,3

В раннем послеоперационном периоде после колопроктологических операций происходит почти двукратное увеличение обсемененности раны *E. coli* [7], значительно возрастает число микроорганизмов, принадлежащих к стрептококкам группы D, *S.aureus* [8], а среди анаэробов-*Bacteroides* [9, 10]. Опыт использования лазеров в различных областях медицины показал их высокую эффективность вследствие широкого спектра положительных эффектов лазерного излучения [2]. Противомикробное действие низкоинтенсивного лазерного излучения, как самостоятельно, так и в виде фотодинамической терапии, т.е. в сочетании с активизируемым им веществом – фотосенсибилизатором, довольно широко исследовано в дерматологической практике и при лечении трофических язв. Излучение гелий-неонового лазера способствует очищению ран от микроорганизмов. Фотодинамическое воздействие обладает мощным бактерицидным эффектом. Противомикробное фотодинамическое воздействие не убывает даже после длительного лечения локальных хронических инфекционных процессов [5].

В 1985 г. из хлорофилла листьев крапивы был синтезирован фотосенсибилизатор хлорин еб. В экспериментах доказано, что бактериальные клетки обладают способностью к аккумуляции экзогенного фотосенсибилизатора. Проведение фотодинамической терапии в присутствии фотосенсибилизатора ведет к поражению бактерий, снижению уровня инфицированности, происходит активация фагоцитарной активности лейкоцитов, ускорение смены стадий процесса заживления язвы, улучшение микроциркуляции крови. Аппликация фотосенсибилизатора на инфицированные язвы не вызывает токсического и провоспалительного действия. Способность фотосенсибилизатора накапливаться в измененных тканях, микробных клетках с реализацией эффекта летальной фотосенсибилизации бактерий была использована при лечении трофических язв, обусловленных хронической венозной недостаточностью нижних конечностей [4].

Цель исследования – изучить влияние низкоинтенсивного лазерного излучения, фотосенсибилизатора хлорофилла и фотодинамической терапии

(хлорофилл + воздействие низкоинтенсивного лазерного излучения) на рост *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, как индикаторных микроорганизмов калового отделяемого; выявить наиболее эффективную лечебную комбинацию.

Материал и методы

В опыт были взяты культуры *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 и *Escherichia coli* ATCC 25922. Смыв дистиллированной водой суточной культуры со скошенного мясопептонного агара каждого вида бактерий предварительно разводили стерильной дистиллированной водой до концентрации $\gg 20\ 000$ микробных тел в 1 мл и затем засеивали шпателем по 0,1 мл на пластинчатый мясопептонный агар в чашках Петри. Были сформированы четыре группы (табл. 2). Для первых двух групп использовали обычный мясопептонный агар без каких-либо добавок, для третьей и четвертой – мясопептонный агар с добавлением 20% фотосенсибилизатора хлорофилла.

Таблица 2

Экспериментальные группы

1. контрольная	посев микроорганизма (<i>Staphylococcus aureus</i> или <i>Escherichia coli</i>)
2. опытная - 1	посев микроорганизма + воздействие низкоинтенсивного лазерного излучения
3. опытная - 2	посев микроорганизма на среду с добавлением фотосенсибилизатора хлорофилла
4. опытная - 3	посев микроорганизма на среду с добавлением фотосенсибилизатора хлорофилла + воздействие низкоинтенсивного лазерного излучения

Сразу после засева поверхность питательной среды в чашках второй и четвертой групп подвергали облучению низкоинтенсивным лазерным излучением (He-Ne, мощность – 20 мВт, длина волны – 632,7 нм) в течение 5 минут. Во время опыта чашки Петри первой и третьей групп находились в тех же температурных условиях, что и облучаемые. После облучения все посева инкубировали при 37°C 24 часа, а затем подсчитывали количество колоний.

Результаты и обсуждение

В контрольных группах количество выросших за сутки микроорганизмов составило $557,333 \pm 25,345$ для *Staphylococcus aureus* и $445,667 \pm 47,604$ для *Escherichia coli*. В первой опытной группе, где после засева поверхность среды подвергалась облучению низкоинтенсивным лазерным излучением, выросло $363,667 \pm 38,922$ колоний *Staphylococcus aureus* и $514,667 \pm 39,441$ колоний *Escherichia coli*. Во второй опытной группе, где засев производился на мясопептонный агар с добавлением 20% фотосенсибилизатора хлорофилла, количество колоний составило $236,667 \pm 6,453$ и $1 \pm 0,577$ для *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* соответственно. В третьей опытной группе, где засев микроорганизмов производился на мясопептонный агар с добавлением 20% фотосенсибилизатора хлорофилла с последующим воздействием низкоинтенсивного лазерного излучения, за сутки выросло

203±3,950 колоний *Staphylococcus aureus* и 0,667±0,337 колоний *Escherichia coli*.

Полученные и статистически обработанные данные отражены в таблице 3.

Таблица 3

Статистические показатели роста *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*

группы	Staphylococcus aureus			Escherichia coli		
	M		m	M		m
1. контрольная	557,333	±56,671	±25,345	445,667	±67,312	±47,604
2. опытная - 1	363,667	±87,030	±38,922	514,667	±55,769	±39,441
3. опытная - 2	236,667	±14,430	±6,453	1	±0,817	±0,577
4. опытная - 3	203	±8,832	±3,950	0,667	±0,476	±0,337
t	t _{1,2} = 4,170 (p < 0,01)			t _{1,2} = 1,120 (вероятность ошибки > 5%)		
	t _{1,3} = 12,261 (p < 0,001)			t _{1,3} = 9,340 (p < 0,01)		
	t _{1,4} = 13,814 (p < 0,001)			t _{1,4} = 9,350 (p < 0,01)		
	t _{3,4} = 4,450 (p < 0,01)			t _{3,4} = 0,499 (вероятность ошибки > 5%)		

Более наглядно результаты исследования можно отразить с помощью рисунка.

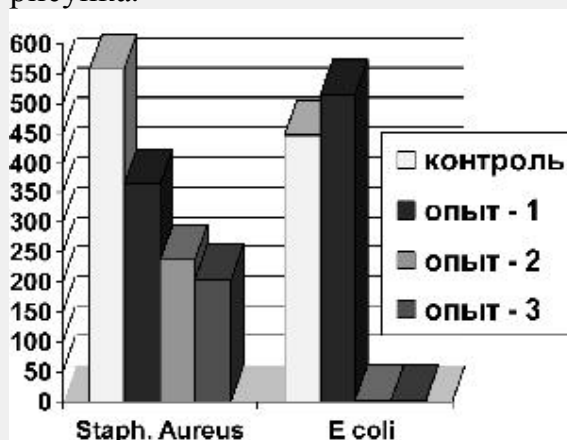


Рис. Количество выросших колоний *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* в различных экспериментальных группах

Полученные результаты свидетельствовали о том, что низкоинтенсивное лазерное излучение достоверно уменьшало рост *Staphylococcus aureus* и не оказывало существенного влияния на рост *Escherichia coli*. Нельзя говорить о стимулирующем воздействии лазера на рост данного микроорганизма, так как различие в числе колоний было недостоверно (вероятность ошибки > 5%). Добавление в питательную среду хлорофилла привело к выраженному угнетению роста *Staphylococcus aureus*, а в сочетании с активизирующим на него воздействием низкоинтенсивного лазерного излучения (то есть в виде фотодинамической терапии) этот эффект достоверно усиливался. В отношении *Escherichia coli* хлорофилл, как самостоятельно, так и в сочетании с воздействием низкоинтенсивного лазерного излучения практически полностью угнетал рост данного микроорганизма. Таким образом,

низкоинтенсивное лазерное излучение выражено подавляло рост грамположительных и не влияло на рост грамотрицательных микроорганизмов. Хлорофилл значительно угнетал рост грамположительных (причем эффект был более выражен при фотодинамической терапии) и практически полностью останавливал рост грамотрицательных микроорганизмов.

Механизм действия, по данным многих авторов, представляется следующим образом [4]: на первом этапе когда производится активизация фотосенсибилизатора с помощью излучателя (лазер или некогерентный источник света), его молекулы начинают интенсивно поглощать световую энергию. Молекула фотосенсибилизатора, поглотив квант света, переходит в возбужденное триплетное состояние и вступает в фотохимические реакции двух типов. При первом типе реакций происходит взаимодействие непосредственно с молекулами биологического субстрата, что в конечном итоге приводит к образованию свободных радикалов. Во втором типе реакций происходит взаимодействие возбужденного фотосенсибилизатора с молекулой кислорода с образованием синглетного кислорода, который является цитотоксическим для живых клеток, благодаря своему свойству сильного окислителя биомолекул. Так как экзогенный фотосенсибилизатор накапливается в бактериальных клетках, то в результате вышеописанного процесса летальной фотосенсибилизации происходит гибель микроорганизма.

Выводы

1. Фотодинамическая терапия с применением фотосенсибилизатора хлорофилла обладает выраженным противомикробным действием в отношении индикаторных для калового отделяемого микроорганизмов.
2. Фотодинамическую терапию можно рекомендовать для использования в колоректальной хирургии в качестве метода эффективной профилактики и лечения послеоперационного калового перитонита.

Литература

1. Алиев, Ф.Ш., Кечеруков, А.И., Лунтовский, А.М., Молокова О.А, Чернов, И.А., Чинарев, Ю.Б.-Морфогенез толстокишечных конце-концевых анастомозов. // Вестник новых медицинских технологий – М.: 2005-Т. XII, №2-С. 19
2. Вишневский, Е.Л., Воздвиженский, С.И., Казанская, И.В., Гаткин, Е.Я., Бирюков, В.В., Банников, В.М., Степанова, Н.А., Коновалов, А.К., Богданов, А.Б.-Использование низкоинтенсивного лазерного излучения при ряде хирургических заболеваний у детей. // Методическое пособие для врачей-Москва, ЗАО “МИЛТА-ПКП ГИТ”, 2001 – С. 12
3. Воробьев, Г.И., Шельгин, Ю.А., Светухин, А.М., Изотова, Г.Н., Нехрикова, С.В., Фролов, С.А., Корнева, Т.К., Максимова, Л.В.-Антимикробная профилактика у больных, оперированных на дистальном отделе прямой кишки, анальном канале и промежности. // Русский медицинский журнал 1999. – Том 1. № 1 – С. 34

4. Жуков, Б.Н., Мусиенко, С.М., Насыров, М.В., Костяев, В.Е.- Фотодинамическая терапия в комплексном лечении вазотрофических нарушений при хронической венозной недостаточности нижних конечностей. // СамГМУ, кафедра госпитальной хирургии, Самара. // <http://www.magicray.ru/RU/article/>
5. Крюк, А.С., Мостовников, В.А., Хохлов, И.В., Сердюченко, Н.С.- Терапевтическая эффективность низкоинтенсивного лазерного излучения. // Мн.: Наука и техника 1986.-с.231.
6. Тихонов, И.А., Басуров, Д.В.-Способы формирования межкишечных анастомозов в колоректальной хирургии. // Хирургия 2002.-№12.-с. 64
7. Lumley, J.W., Siu, S.K., Pillay, S.P., Kemp, R.J., Faoagali J., et al. Single dose ceftriaxone as prophylaxis for sepsis in colorectal surgery. Aust., N.Z.J. Surg 1992; 62: 292-6.
8. Morris, W.T.-Ceftriaxone is more effective than gentamicin/metronidazole prophylaxis in reducing wound and urinary tract infections after bowel operations. Dis Colon Rectum 1993; 36: 826-33.
9. McArdle, C.S., Morran, C.G., Pettit L., Gemell, C.G., Sleight, J.D., Tillotson, G.S. Value of oral prophylaxis in colorectal surgery. Br J Surg 1995;.82:.1046-8.
10. Santilli F., Narciso, N., Bifano, D., Villano, M. Antibiotic prophylaxis in elective neurosurgery. Minerva Chir. 1994; 49: 829-36.