

И.С. Кармалькова, О.А. Юдина, Л.А. Казеко, Т.В. Трухачева

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ С ПРЕПАРАТОМ «ФОТОЛОН» В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ЭРОЗИВНО-ЯЗВЕННЫХ ПОРАЖЕНИЙ ПОЛОСТИ РТА

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Несмотря на многочисленные преимущества использования ФДТ в клинической практике, этот метод пока еще не получил широкого распространения для лечения эрозивно-язвенных поражений слизистой оболочки рта.

В ходе экспериментального исследования установлено, что применение фотодинамической терапии с фотосенсибилизатором «Фотолон» препятствует проникновению микроорганизмов и содержимого ротовой полости в дефект, что предотвращает образование распространённого дефекта, уменьшает воспаление и способствует быстрой регенерации и позволяет предположить, что данный метод будет эффективен в клинической практике.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, эрозивно-язвенные поражения полости рта, фотосенсибилизаторы, методы лечения эрозивно-язвенной патологии полости рта, мазь для наружного применения «Фотолон».

I.S. Karmalkova, O.A. Yudina, L.A. Kazeka, T. V. Trukhachova

EXPERIMENTAL JUSTIFICATION OF POSSIBILITY FOR ADMINISTRATION OF PHOTODYNAMIC THERAPY WITH «FOTOLON» FOR THE MANAGEMENT OF ULCERATIVE AND EROSIIVE LESIONS OF ORAL MUCOSAE MEMBRANE

Photodynamic therapy is a therapy modality that employs the combination of visible light, a drug (called photosensitizer or dye), and molecular oxygen usually present in the tissue.

Nowadays PDT is used in different fields of medicine, but by far it remains underutilized as therapeutic modality used for the management of oral mucosae diseases.

In this study, «Fotolon»-mediated photodynamic therapy was used as a possible alternative method for the treatment of ulcerative and erosive lesions of oral mucosae membrane.

«Fotolon»-mediated photodynamic therapy seems to be an affective alternative method for the treatment of ulcerative and erosive lesions of oral mucosae membrane.

Key words: photodynamic therapy, ulcerative and erosive lesions in dentistry, treatment of ulcerative and erosive lesions of oral mucosae membrane, photosensitizing drug, «Fotolon».

Лазерная медицина как самостоятельное направление сформировалась в последней четверти XX века, ознаменовав не только огромный прогресс в области создания медицинских лазерных аппаратов, но и в сфере освоения их врачами, что обеспечило широкое внедрение лазерных технологий в практику здравоохранения. Сегодня трудно себе представить развитие медицинской науки и практики без использования лазеров как для лечения, так и для диагностики [14].

В настоящее время наиболее интенсивно развиваются лазерная хирургия, лазерная терапия, лазерная диагностика и фотодинамическая терапия [14, 17, 24].

Фотодинамическая терапия-метод сочетанной лазерной терапии, основанный на избирательном накоплении фоточувствительного препарата (фотосенсибилизатора) в клетках-мишенях с последующим облучением их светом определенной интенсивности и длины волны [1, 4, 12, 14, 16, 23].

Фотодинамическая терапия - трехкомпонентный метод лечения. Два компонента - фотосенсибилизатор и свет являются экзогенными внешними факторами. Третьим обязательным компонентом фотодинамической реакции является эндогенный фактор - кислород [13, 19, 24]. Основой ФДТ является химическая реакция, развивающаяся в биологических тканях после введения экзогенного фотосенсибилизатора

и воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения с длиной волны, соответствующей пику поглощения данного фотосенсибилизатора. При облучении сенсibilизированной ткани молекула фотосенсибилизатора, поглотив квант излучения, переходит в возбужденное состояние и затем вступает в фотохимические реакции [3, 12, 16, 24]. При этом возможны три типа реакций. При первом типе молекула фотосенсибилизатора в триплетном состоянии взаимодействует непосредственно с молекулами биологического субстрата. В результате этого взаимодействия образуются свободные радикалы - активные окислители биологических структур. В реакции второго типа энергия молекул фотосенсибилизатора передается молекуле кислорода, в результате чего образуется синглетный кислород, который, будучи сильным окислителем биологических молекул, еще более токсичен для патологических клеток, чем просто свободные радикалы [1, 3, 10, 12, 20, 24]. Возбужденные молекулы кислорода и фотосенсибилизатора возвращаются в исходное состояние и способны повторно вступать в химические реакции.

Весь цикл может быть запущен заново после поступления нового кванта световой энергии. После нескольких циклов фотосенсибилизатор может терять способность участвовать в фотодинамической реакции (этот эффект называется «фотобличингом») [1, 3, 16, 17]. В фотодинамических процессах ре-

акции первого типа играют незначительную роль, а основное значение придается реакции второго типа. Третьим вариантом преобразования энергии, полученной при поглощении квантов излучения, является флюоресценция. [3, 12, 16, 22].

Базовые фотобиологические принципы, лежащие в основе механизма светотерапии:

1. Закон Grotthus-Draper (1817, 1843). Фотохимическое превращение может происходить под действием только того света, который был поглощен веществом [4, 6].

2. Закон Stark-Einstein (1908, 1912). Каждая молекула, участвующая в химической реакции, идущей под действием света, поглощает только один квант излучения, который вызывает реакцию [6].

3. Закон Bunsen-Roscoe (1855). Количество продуктов фотохимической реакции определяется не интенсивностью, а дозой излучения. Таким образом, малую интенсивность облучения можно компенсировать длительным временем облучения [4, 6].

Ключевая роль при фотодинамической терапии принадлежит способности фотосенсибилизатора локализоваться преимущественно в клетке-мишени, что приводит к ее повреждению при активации красителя светом и сводит к минимуму сопутствующее поражение окружающих тканей [1, 8, 12, 17, 20, 22].

Известно более 400 веществ, обладающих фотосенсибилизирующим действием [5, 19, 22]. К числу фотодинамически активных соединений относятся многие красители (ксантины, акридины, тиазины), физиологически активные фармакологические вещества (порфирины, рибофлавин, хиноны, анестетики, антибиотики, барбитураты и др.) [5, 6, 19, 22].

Фотосенсибилизаторы, применяемые для фотодинамической терапии, должны обладать рядом отличительных свойств:

1. Существенно повышать чувствительность биологических сред и тканей к свету, лазерному излучению;

2. Избирательно захватываться и длительно задерживаться поврежденными клетками и тканями патологического очага;

3. Легко определяться с помощью флюорисцентного метода, что позволяет одновременно использовать их в диагностических целях;

4. Не должны быть токсичны (низкая темновая и световая токсичность в терапевтических дозах);

5. Должны иметь сильное поглощение в спектральном диапазоне, где биологические ткани имеют наибольшее пропускание (красный и ближний инфракрасный диапазоны);

6. Должны иметь оптимум между величинами квантового выхода флюоресценции и квантового выхода интерконверсии, которая определяет способность фотосенсибилизатора к генерации синглетного кислорода (в то же время, способность фотосенсибилизатора флюоресцировать обуславливает его диагностические возможности и облегчает контроль накопления и выведения его из тканей);

7. Должны иметь высокий квантовый выход образования синглетного кислорода в условиях *in vivo*;

8. Иметь высокую доступность получения или синтеза, однородный химический состав;

9. Быть стабильными при световом воздействии и хранении [1, 4, 10, 16, 18, 19, 22, 24].

В соответствии с принятой классификацией, фотосенсибилизаторы разделяются на три поколения. Фотосенсибилизаторы первого поколения-производные гематопорфирина («Фотогем» Россия, «Фотосан» Германия и др.) Фотосенсибилизаторы второго поколения - фталоцианины, нафталоцианины, бензопорфирины, тексафирины, порфицены. Данные соединения малотоксичны, легко проникают через мембрану клетки, селективно накапливаются в патологических клетках [1, 3, 12, 14, 16, 17]. Отдельного внимания заслуживают препараты так называемого «третьего поколения», получаемые путем связывания молекулы фотосенсибилизатора с молекулами других веществ, наночастицами или липосомами с целью улучшения селективности накопления фотосенсибилизатора в патологических клетках [12, 18, 21]. Одним из примеров подобных фотосенсибилизаторов является лекарственное средство «Фотолон», разработанное и выпускаемое РУП «Белмедпрепараты» (Республика Беларусь) [18].

Фотолон представляет собой молекулярный комплекс соли хлорина е6 и поливинилпирролидона. Хлорин е6 получают из биомассы водоросли *Spirulina platensis* [18].

Преимуществами препарата «Фотолон» перед другими фотосенсибилизаторами являются:

1. Быстрое и избирательное накопление в патологической ткани;

2. Высокая лечебная и диагностическая эффективность;

3. Высокая стабильность в течение срока хранения [18, 21].

На современном этапе развития фотодинамическая терапия применяется во многих областях медицины. Несмотря на преимущества использования ФДТ (снижение риска развития осложнений у пациентов с соматической патологией, отсутствие системного воздействия на организм, сокращение времени лечения пациентов, безболезненность манипуляций, альтернативу традиционным антимикробным препаратам, высокую избирательность воздействия, возможность одновременного лечения и диагностики, комбинированное воздействие на очаг поражения, возможность применения в сочетании с традиционными методами лечения [2, 4, 12, 13, 14, 16, 22, 23] и убедительные данные об эффективности применения фотодинамической терапии в медицинской практике и, в частности, в стоматологии [5, 6, 7, 8, 9, 11], этот метод пока еще не получил широкое распространение для лечения эрозивно-язвенных поражений слизистой оболочки рта.

Материалы и методы

Цель исследования: изучить влияние фотодинамической терапии с фотосенсибилизатором «Фотолон» на характер репаративных процессов слизистой оболочки рта лабораторных животных.

Для изучения влияния фотодинамической терапии с фотосенсибилизатором «Фотолон» на характер репаративных процессов слизистой оболочки рта нами были выбраны собаки.

Применение собак для экспериментальных исследований в данной научно-исследовательской работе обусловлено следующим:

1) невозможностью моделирования эрозивно-язвенных поражений требуемого размера и количества на слизистой оболочке рта мелких лабораторных животных в связи с недостаточным объемом ротовой полости;

2) большим сходством строения слизистой оболочки поло-

сти рта человека и собаки, по сравнению с мелкими лабораторными животными, что способствует получению более точных экспериментальных данных.

Эксперимент проходил в виварии УО «Белорусский государственный медицинский университет» в соответствии с правилами работы с лабораторными животными, с учетом принципов Всемирного общества защиты животных (WSPA). Все животные содержались в стандартных условиях вивария и на стандартном пищевом режиме.

За 5 дней до начала эксперимента всем собакам была проведена профессиональная гигиена полости рта. В первые сутки экспериментального исследования моделировались язвенные поражения слизистой рта (по 5 язв на слизистой оболочке щеки у 8 собак, разделенных на 2 группы). На 2-5 сутки проводилась фотодинамическая терапия с фотосенсибилизатором «Фотолон» (группа лабораторных животных №1) и традиционное лечение (группа лабораторных животных №2).

В качестве источника лазерного излучения был применен

фототерапевтический аппарат «Снаг-Сенс-К» производства ПК «Люзар» (Республика Беларусь), с максимальной мощностью до 300 мВт и длиной волны 670 нм.

Терапевтический аппарат «Снаг-Сэнс-К» характеризуется повышенной интенсивностью лазерного излучения «красной» области спектра, что обеспечивает проведение фоторегуляторной терапии с максимально глубоким проникновением излучения в ткань и возможность проведения фотодинамической терапии и флюорисцентной диагностики.

Группа лабораторных животных №1:

Первой группе лабораторных животных фотосенсибилизатор «Фотолон» на стерильной марлевой повязке помещался в полость рта на область ранее смоделированных язвенных поражений на 10 минут, что соответствует оптимальному времени экспозиции препарата для проникновения в патологические ткани [18]. Избытки фотосенсибилизатора удаляли стерильной салфеткой и проводили сеанс фотодинамической терапии.

Группа лабораторных животных №2:

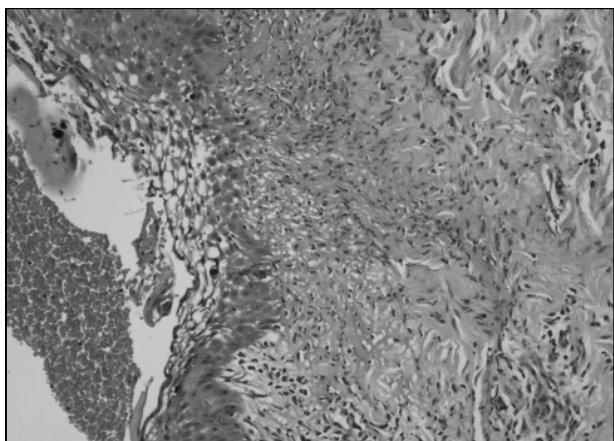


Рис. 1а. Микроскопическая картина изменений многослойного плоского эпителия в субэпителиальной зоне в группе с фотодинамической терапией (окраска гематоксилин и эозин, ув.х50)

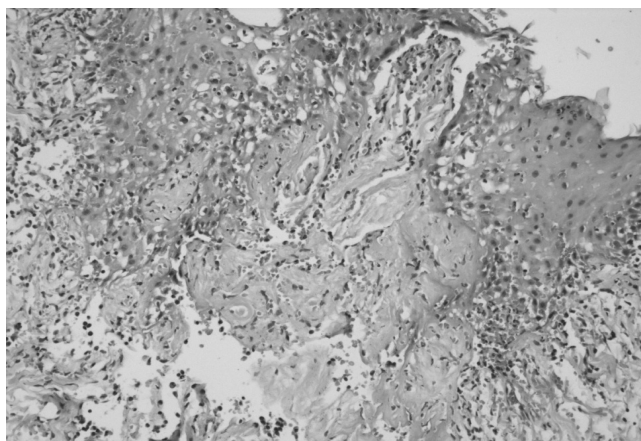


Рис. 1б. Микроскопическая картина изменений многослойного плоского эпителия в субэпителиальной зоне в группе с традиционным методом лечения (окраска гематоксилин и эозин, ув.х50)

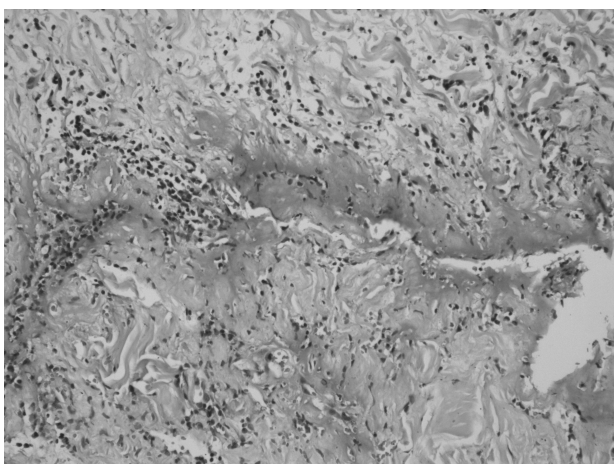


Рис. 2а. Микроскопическая картина формирования язвенного дефекта в группе с фотодинамической терапией (окраска гематоксилин и эозин, ув.х200)

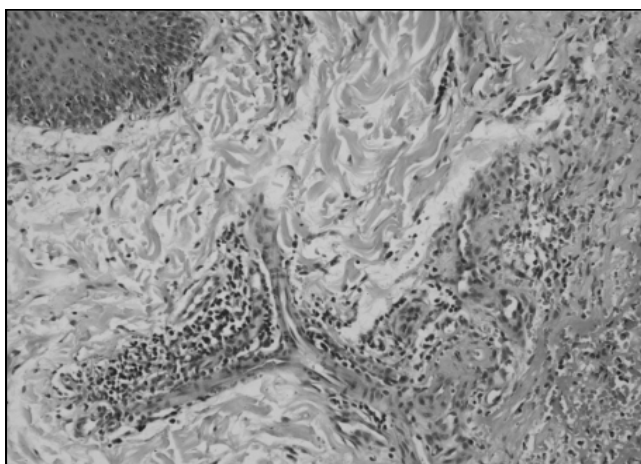


Рис. 2б. Микроскопическая картина формирования язвенного дефекта в группе с традиционным методом лечения (окраска гематоксилин и эозин, ув.х200)

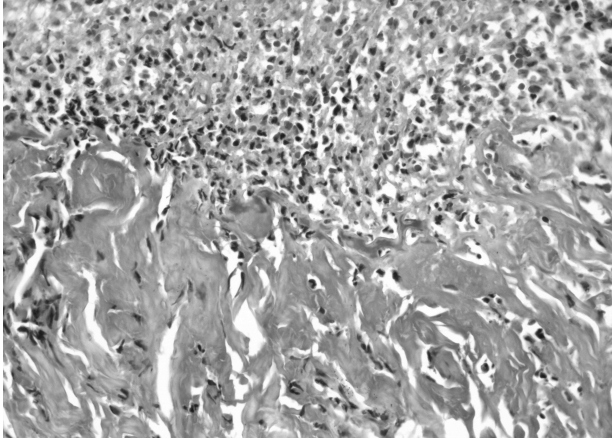


Рис. 3а. Микроскопическая картина вовлечения нервных стволиков в патологический процесс в группе с фотодинамической терапией (окраска Martius-Scarlett-Blue, ув.х400)

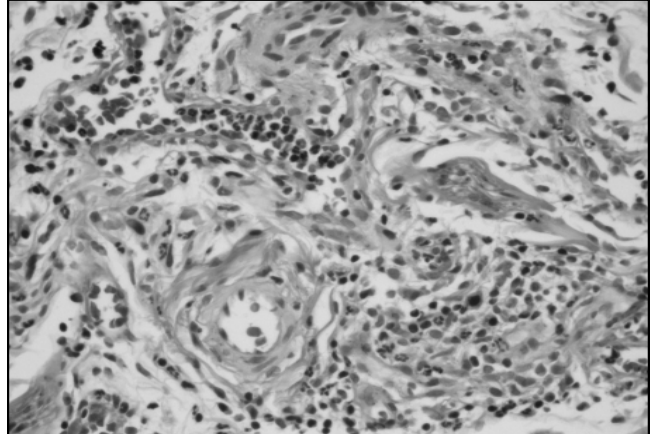


Рис. 3б. Микроскопическая картина вовлечения нервных стволиков в патологический процесс в группе с традиционным лечением (окраска Martius-Scarlett-Blue, ув.х400)

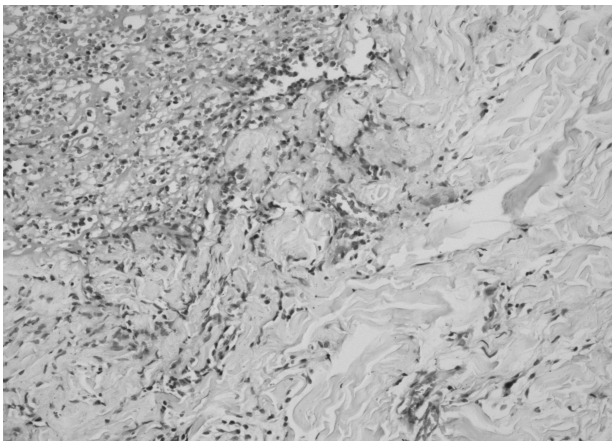


Рис. 4а. Микроскопическая картина очищения язвенного дефекта от детрита в группе с фотодинамической терапией (окраска гематоксилин и эозин, ув.х200)

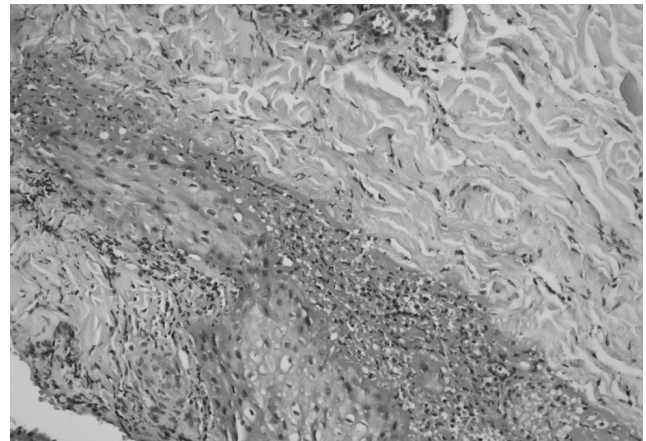


Рис. 4б. Микроскопическая картина очищения язвенного дефекта от детрита в группе с традиционным лечением (окраска гематоксилин и эозин, ув.х200)

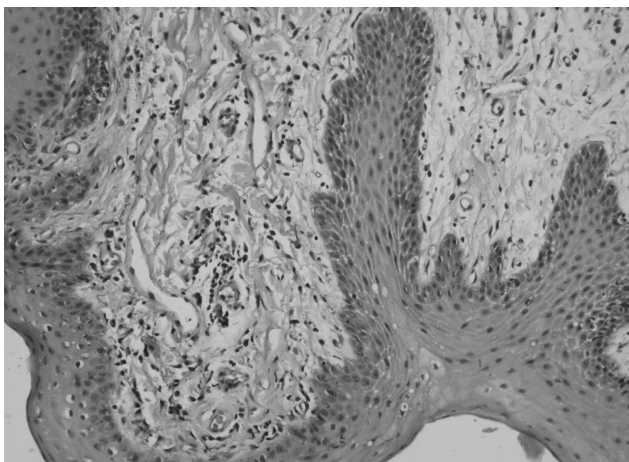


Рис. 5а. Микроскопическая картина «заживления» язвенного дефекта в группе с фотодинамической терапией (окраска гематоксилин и эозин, ув.х200)

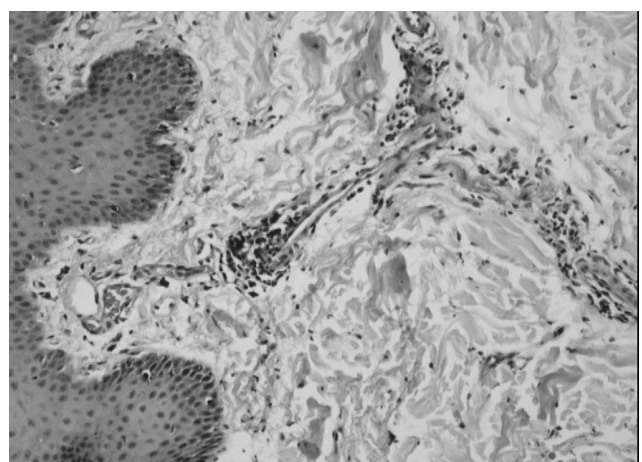


Рис. 5б. Микроскопическая картина «заживления» язвенного дефекта в группе с традиционным лечением (окраска гематоксилин и эозин, ув.х200)

Второй группе лабораторных животных проводилось традиционное лечение язвенных поражений слизистой оболочки рта с орошением полости рта 0,05% водным раствором хлоргексидина и аппликацией мазей «Репарэф-1» и «Репарэф-2» [15].

Моделирование язв на слизистой оболочке щеки у собак и забор морфологического материала проводились под внутривенным тиопенталовым наркозом. Морфологический материал забирался ежедневно, после проведения лечебных процедур в двух сравниваемых группах.

Ткани были фиксированы 10% нейтральным формалином и заключены в парафин. Толщина гистологических срезов составила 5 мкм. Все препараты окрашивались гематоксилином и эозином. Использовали также окраску Martius-Scarlett-Blue для выявления повреждений в субэпителиальной соединительной ткани и коллагеновых волокнах. Морфометрическое исследование сосудов микроциркуляторного русла и экстрацеллюлярного матрикса проводили с помощью планиметрической линейки Г.Г. Автандилова.

При оценке влияния ФДТ на характер репаративных процессов слизистой оболочки рта оценивали состояние многослойного плоского эпителия, изменение сосудов, коллагеновых волокон и нервных стволиков в субэпителиальной зоне, учитывался характер и выраженность воспалительной инфильтрации в зоне повреждения.

Результаты и обсуждение

1. Оценка изменений многослойного плоского эпителия в субэпителиальной зоне.

В группе лабораторных животных с фотодинамической терапией (рис. 1А) многослойный плоский эпителий страдает в меньшей мере, наблюдается гидропическая дистрофия. Многослойный плоский эпителий не десквамируется, дефект остается «закрытым»: нет контакта с содержимым ротовой полости и микроорганизмами.

При традиционном методе лечения повреждения многослойного плоского эпителия характеризуются мультифокальностью (рис.1Б).

2. Формирование язвенного дефекта.

При проведении фотодинамической терапии формируется неглубокий субэпителиальный дефект (рис. 2А). Некроз в этой группе отсрочен по времени, отсутствует воспалительная инфильтрация, дефект «стерилен».

Формирование язвенного дефекта в группе с традиционным лечением запаздывает (рис. 2Б), однако дефект формируется широкий, по нашему мнению, это происходит, за счет мультифокальности повреждения.

3. Вовлечение нервных стволиков.

В группе с фотодинамической терапией не наблюдалось вовлечения нервных стволиков в патологический процесс (рис 3А).

При применении раствора хлоргексидина и мазей «Репарэф-1» и «Репарэф-2» (группа с традиционным лечением) инфильтрат плотный, преимущественно периваскулярный и периневральный (рис. 3Б), что в клинической практике обуславливает наличие болевого синдрома.

4. Очистление дефекта от детрита.

Очистление дефекта от детрита происходит неравномерно в сравниваемых группах. В группе с фотодинамической терапией к 4 суткам дефект еще не очистился от детрита, в связи с фиксации струпа к дефекту. В этой группе за счет сдавливания

тканей некротическим массами и струпом, коллагеновые волокна утолщаются, объединяются между собой, а объём соединительной ткани в зоне дефекта уменьшен (рис 4А).

На 3 сутки при проведении традиционного лечения остаются очаги эпителиального покрова (рис 4Б).

5. «Заживление» дефекта.

В группе с фотодинамической терапией после очищения дефекта от струпа заживление происходит быстро (рис. 5А).

В зажившем дефекте в группе с традиционным лечением сохраняется скудный воспалительный периваскулярный инфильтрат и единичные огрубевшие коллагеновые волокна (рис. 5Б).

Таким образом, применение фотодинамической терапии с фотосенсибилизатором «Фотолон» препятствует проникновению микроорганизмов и содержимого ротовой полости в дефект, что предотвращает образование распространённого дефекта, уменьшает воспаление, способствует быстрой регенерации и позволяет предположить, что данный метод будет эффективен в клинической практике.

Литература

1. Гейниц, А.В., Сорокатый А.Е., Ягудаев Д.М. Трухманов Р.С. Фотодинамическая терапия. История создания метода и ее механизмы // *Лазерная медицина*.-2007.-Т.11, вып.3.-С. 42-46.
2. Гейниц, А.В., Баум Р.Ф., Зарецкий А.М. Фотодинамическая терапия в лечебной практике // *Лечащий врач*.-2005.- №2.-С. 74-75.
3. Казеко, Л.А., Кармалькова И.С. Возможность применения фотодинамической терапии для лечения эрозивно-язвенных поражений слизистой оболочки ротовой полости // *Медицинские новости*.- 2012.-№5.- С. 21- 24.
4. Карандашов, В.И., Петухов Е.Б., Зродников В.С. Фототерапия. Руководство для врачей.-М.: Медицина, 2001.
5. Курочкина, А.Ю. Клиническая оценка эффективности различных схем фототерапии заболеваний пародонта / А.Ю. Курочкина // *Стоматология Беларуси* в новом тысячелетии: материалы 9-й междунар. научн.-практ. конф. по стоматологии в рамках 64-й специализированной выставки «Стоматология Беларуси 2010» (Минск, 28-30 октября 2010 года).- Минск, 2010.- С. 43-46.
6. Курочкина, А.Ю. Использование фототерапии в лечении болезней пародонта: современные аспекты и перспективы применения в Республике Беларусь(обзор литературы) // *Медицина*.-2008.-№ 3.- С. 36-39.
7. Лукавенко, А.А. Фотодинамическая терапия в пародонтологической практике // *Пародонтология*.- 2011.- № 2.- С. 67-70.
8. Наумович, С.А., Плавский Ю.В., Петров П.Т., Кувшинов А.В. Новое в лечении заболеваний пародонта: фотодинамическая терапия // *Современная стоматология*.- 2007.- №2.- С. 27-29.
9. Орехова, Л.Ю., Лукавенко А.А., Пушкарев О.А. Фотодинамическая терапия в клинике терапевтической стоматологии // *Клиническая стоматология*.-2009.-№1.-С.26-30
10. Пальчун, В.Т., Лапченко А.С., Лапченко А.А., Гуров А.В. Современный взгляд на антимикробную фотодинамическую терапию // *Вестник оториноларингологии*.-2007.-№3.- С. 4-6.
11. Рисованная, О.Н., Рисованной С.И. Лазерные технологии-новая реальность в лечении воспалительных заболе-

ваний полости рта // *Маэстро стоматологии*.-2003.-№3.-С. 44-52.

12. Салмин, Р.М., Стенько А.А., Жук И.Г., Брагов М.Ю. основные направления фотодинамической терапии в медицине// *Новости хирургии*.-2008.-№3.-С.155-162.

13. Странадко, Е.Ф., Корабоев У.М., Толстых М.П. Фотодинамическая терапия при гнойных заболеваниях мягких тканей // *Хирургия*.-2000.-№ 9.-С.67-70.

14. Улащик, В.С. Фотодинамическая терапия и ее применение в клинической медицине// *Здравоохранение*.-2006.-№6.-С.24-28.

15. Федорова, И.Н. Применение препаратов биена (комплекса этиловых эфиров полиненасыщенных жирных кислот) для лечения больных с эрозивно-язвенными поражениями слизистой оболочки полости рта // *Вестн. Смолен. мед. акад.*- 2003.- № 3.- С. 49-50.

16. *Фотодинамическая терапия* / Под ред. М.П.Голдмана; ред. Сер. Дж.С. Доувер при участии М. Алама; пер. с англ. Под общ. Ред. В.А. Виссарионова.- Москва: «Рид Эльсивер», 2011.- 120 с.

17. *Фотодинамическая терапия*/ А.Ф. Цыб, М. А.Каплан, Ю. С. Романко, В.В. Попучиев.- М.: ООО "Медицинское информационное агенство", 2009.-192 с.

18. «Фотолон» – новое средство для фотодинамической

терапии / Т.В.Трухачева, С.В.Шляхтин, Г.А.Исаков, Ю.П. Истомин.- Минск: РУП «Белмедпрепараты», 2009.- 64 с.

19. Ягудаев, Д.М., Сорокаий А.Е., Гейниц А.В., Труханов Р.С. Современный взгляд на механизм фотодинамической терапии. Фотосенсибилизаторы и их биодоступность. // *Урология*.-2006.-№5.-С.94-98.

20. All you need is light. Antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease/ Tyler G. St. Denis [et al.] // *Virulence*.- 2011.-Volume 2 Issue 6.-P. 509-520.

21. Bactericidal Effects of the Fotolon (Chlorin e6) on Gram-Negative and Gram-Positive Strains Isolated from Wound Infections/ Zuzanna Drulis-Kawa [et al.] // *Adv Clin Exp Med*.-2006.-№15.-P 279-283.

22. Guidelines for topical photodynamic therapy: update / C.A. Morton[et al.] // *British Journal of Dermatology*.-2008.-159.-P. 1245-1266.

23. Photodynamic therapy for localized infections-state of the art / Tianhong Dai [et al.] // *Photodiagnosis Photodyn Ther*.- 2009.- №6(3-4).- P.170-188.

24. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update/ Patrizia Agostinis [et al.] // *A Cancer Journal for Clinicians*.-2011.- №61.- P. 250-281.

Поступила 11.11.2013 г.