

ВЛИЯНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПОЛИМЕРОВ НА АКТИВНОСТЬ ФОТОДИТАЗИНА ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ГНОЙНЫХ РАН МЯГКИХ ТКАНЕЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Соловьева А.Б.¹, Спокойный А.Л.², Руденко Т.Г.³, Шехтер А.Б.³,

Глаголев Н.Н., Аксенова Н.А.¹, Баранов А.В.²

¹Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН

²ФГБУ «ГНЦ ЛМ ФМБА России»

³ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России

В данной статье представлены результаты исследования влияния водорастворимых полимеров на активность препарата «Фотодитазин» и течение раневого процесса при фотодинамической терапии гнойных ран у крыс. Приведены данные макроскопического и гистологического исследования состояния ран до и после проведения фотодинамической терапии с указанными системами, а также оценены качество и степень выраженности репаративных процессов под влиянием фотодинамической терапии с препаратом «Фотодитаин» и его комплексов с водорастворимыми полимерами – природным полисахаридом хитозаном и тройным блок-сополимером этилен- и пропиленоксида (плюронином F127). Показано, что наиболее эффективной при фотодинамической терапии гнойных ран у крыс является система «Фотодитазин» – и плюроник-хитозан. Дано обоснование необходимости присоединения к препарату «Фотодитазин» Плюронином F127 как средства снижения цитотоксического действия данного препарата.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, «Фотодитазин», лечение ран.

USE OF AN AQUEOUS SOLUTION «PHOTODITAZIN», COMPLEXED WITH A VARIETY OF POLYMERS FOR THE TREATMENT OF PURULENT WOUNDS OF SOFT TISSUE EXPERIMENT

Solovyeva A.B., Spokoyniy A.L., Rudenko T.G., Shekhter A.B.,
Glagolev N.N., Aksenova N.A., Baranov A.V.

The article presents the results of a study of water-soluble polymers effects on the “Photoditazin” activity and the course of wound process under photodynamic therapy of purulent wounds in rats. The data of macroscopic and histological study of wounds status before and after photodynamic therapy, and assessed the quality and degree of intensity of reparative processes under influence of photodynamic therapy with the drug “Photoditazin” and its complexes with water-soluble polymers of natural polysaccharide chitosan and a triple block copolymer of ethylene- and propylene oxide (pluronic F127). It was given the rationale for Pluronic F127 joining to the drug “Photoditazine” for reducing the cytotoxic effects of the drug.

Key words: photodynamic therapy, “Photoditazine”, treatment of wounds.

Настоящая работа является продолжением ранее выполненных исследований в рамках гранта РНФ 16-13-10295 по изучению влияния местной лазерной фотодинамической терапии (ФДТ) на течение раневого процесса в асептических и инфицированных полнослойных ранах кожи. В этих экспериментах ФДТ проводили, используя в качестве фотосенсибилизаторов водный раствор фотодитазина и его комплексы с различными амфифильными и другими полимерами.

В ходе проведения ряда экспериментов было показано, что ФДТ с использованием водного раствора фотодитазина заметно усиливает репаративные процессы в ранах. Однако отмечено, что фотодитазин вызывал выраженную геморрагическую реакцию, проявляющуюся наличием диapedезных кровоизлияний в ткани дна ран. Наряду с этим было установлено, что плуроник F127 способен ослабить негативное воздействие фотодитазина на микрососуды и предотвратить развитие местной геморрагической реакции, осложняющей заживление раны.

В экспериментах на модели инфицированной раны ФДТ с использованием комплекса «фотодитазин-плуроник-хитозан» были получены данные о благоприятном течении раневого процесса. Наряду с отсутствием геморрагических проявлений наблюдалась наибольшая степень снижения воспалительной реакции с одновременным усилением регенераторно-репаративных признаков. Был сделан предположительный вывод о том, что в условиях фотоактивации хитозан усиливает антибактериальный, противовоспалительный и прорегенераторный эффекты комплекса «фотодитазин-плуроник».

Материал и методы исследования

В ходе исследования была выполнена серия экспериментов на 56 белых лабораторных крысах-самцах с массой тела 120-140 г., полученных из питомника экспериментальных животных Научного центра биомедицинских технологий РАМН (филиал «Столбовая»).

Животные содержались в стандартных условиях вивария, по 1 особи в клетке, получали кормление комплексным гранулированным лабораторным кормом при постоянном доступе к воде («Правила по обращению, содержанию, обезболиванию и умерщвлению экспериментальных животных», Приказ №267 МЗ РФ от 19.06.2003).

Серия включала 4 группы экспериментов (по 14 животных в каждой):

Группа	Кол-во животных	Средство обработки ран (1,0 мл)
1 группа (контрольная)	14	Изотонический раствор хлорида натрия + ФД-активация
2 группа	14	водный раствор фотодитазина (2мг/мл) + ФД-активация
3 группа	14	комплекс «фотодитазин-хитозан «Биопрогресс» + ФД-активация
4 группа	14	комплекс «фотодитазин-хитозан «Биопрогресс»-плуроник» + ФД-активация
ИТОГО	56	

Ход и порядок проведения эксперимента

На следующий день после нанесения раны (использована модель полнослойной плоскостной раны с кольцами-втулками, Л.И. Слущкий, 1969, А.В. Shekhter et al., 2005) начинали их обработку.

Проводили обкалывание дна раны исследуемыми средствами в соответствии с вышеперечисленными группами. Не снимая плёнки с поверхности кольца, шприцом из нескольких вколов (3-4) вводили испытуемые средства (общее количество – 1,0 мл) в мягкие ткани дна раны.

После введения фотосенсибилизатора животных помещали в темный бокс и через 15 мин начинали ФД-активацию ран, используя в качестве источника излучения Аппарат фототерапевтический светодиодный «АФС» (ООО «Полироник», Россия), $\lambda=660$ нм, мощность 700 мВт. Дно раны облучали расфокусированным лучом (диаметр пятна облучения $\approx 0,5-0,8$ см), сканирующими круговыми перемещениями световода в течение 1 минуты. Процедуру повторяли на 3-и сутки после нанесения раны.

На 4-е сутки после нанесения раны (следующие сутки после последнего облучения) животных в обычном порядке выводили из эксперимента и изымали раневые ткани для последующего гистологического изучения.

Результаты исследования

Макроскопическая оценка клинической картины состояния ран

На следующие сутки после операции общее состояние животных во всех группах удовлетворительное. Клиническая картина состояния ран у всех животных однотипна. Экссудат отсутствует, раневая поверхность покрыта тонкой пленкой фибрина, перифокальная реакция во всех случаях слабо выражена. В этот срок проведен первый сеанс ФД-активации.

На следующие сутки после облучения в состоянии ран отмечены некоторые изменения.

В 1-й (контрольной) группе на поверхности раны появился в небольшом количестве серозный экссудат, но в целом клиническая картина ран практически не изменилась. В то время как в остальных группах, где ФД-активация проводилась на фоне фотодитазина и его комплексов, в ранах присутствовал серозно-геморрагический экссудат, однако во 2-й и 3-й группах он был выражен в значительно большей степени, чем в 4-й группе. Общее состояние животных оставалось удовлетворительным.

На следующий день, после 2-го сеанса ФД-активации (4-е сутки от начала эксперимента) общее состояние животных и клиническая картина ран практически не изменились. При иссечении тканей раны отмечено, что они и окружающие рану ткани имеют интенсивное красно-бурое прокрашивание, за исключением животных в группе 4. Сам пласт ткани, заполняющей рану, относительно тонкий, рыхлый, слизисто-отечный.

Результаты гистологического изучения

1 группа (контроль) – физ.раствор+ ФД-активация

На дне раны располагается фибринозно-лейкоцитарный слой, содержащий большое количество нейтрофилов, большая часть которых имеет признаки распада. Под этим слоем остается слой жировой клетчатки, инфильтрованный нейтрофилами и макрофагами и пророщенный местами тяжами фибробластов. Глубже располагается слой грануляционной ткани, которая содержит многочисленные фибробласты, капиллярные «почки» и сосуды с просветом (рис. 1 и 2). Местами в грануляционной ткани и клетчатке отмечаются небольшие очаги диапедезных кровоизлияний.

Следует отметить, что развитие грануляционной ткани в группе с облучением было выражено в большей степени, чем в контрольной группе с проведением традиционного лечения (Хлоргексидин 0,05%) в предыдущей серии экспериментов.

2 группа – водный раствор фотодитазина+ФД активация

Как и в контроле, дно раны выстлано относительно толстым фибринозно-лейкоцитарным слоем. Отличием от контроля является большее развитие грануляционной ткани. Она занимает несколько большую площадь, новообразованные сосуды в ней в основном уже имеют просвет, но не заполнены эритроцитами (рис. 3). Такая картина отмечалась у 3-х животных, а у одного животного грануляционная ткань была развита очень слабо, в то время как фибринозно-лейкоцитарный слой отличался большей толщиной. Следует отметить, что у 2-х животных отмечались диапедезные кровоизлияния, степень выраженности которых несколько выше, чем в контроле.

3 группа – комплекс «фотодитазин-хитозан «Биопрогресс»+ФД активация

У двух животных фибринозно-лейкоцитарный слой имеет такую же структуру и толщину, как в

предыдущей группе. Отличием является повышенное количество эритроцитов в этом слое. Оставшийся жировой слой инфильтрирован нейтрофилами и макрофагами. Его отличие от предыдущей группы также заключается в том, что просветы сосудов расширены, полнокровны, а вокруг них отмечаются диапедезные кровоизлияния, местами сливающиеся между собой и выраженные не менее сильно, чем в первых двух группах. Слой грануляционной ткани толще, чем в предыдущей группе, а сама она значительно более зрелая, в ней больше новообразованных сосудов с просветами, но больше сосудистых «почек», количество фибробластов уменьшено.

Следует отметить, что в грануляционной ткани видны крупные очаги диапедезного кровоизлияния, что свидетельствует о повышенной проницаемости сосудистых стенок (рис. 4). У одного животного имеется толстый фибринозно-лейкоцитарный слой, а грануляционная ткань практически отсутствует.

4 группа – комплекс «фотодитазин-хитозан «Бипрогресс»-плюроник+ФД активация

Фибринозно-лейкоцитарный слой толстый, с большим числом нейтрофилов и эритроцитов. Грануляционная ткань развита сильнее, чем в группе 3 этой серии (без плюроника). Степень зрелости грануляционной ткани одинакова, но в этой группе она в значительной мере прорастает жировую клетчатку.

Важно отметить, что в грануляционной ткани имеется меньшее число диапедезных (местами сливающихся) кровоизлияний, по сравнению с группой 3 (рис. 5).

Заключение

В результате клинических наблюдений и макроскопической оценки состояния ран в настоящих экспериментах установлено, что:

- В контроле (изотонический раствор натрия хлорида + ФД-активация) воспалительные изменения были умеренными, при этом во всех случаях наблюдалось развитие грануляционной ткани по сравнению с традиционным лечением (раствор Хлоргексидина 0,05%) проводившимся в предыдущей серии экспериментов. Это соответствует полученным ранее данным о стимулирующем влиянии лазерного (светодиодного) излучения.

- Важно отметить, что воспалительные изменения в группах 2, 3, 4 были выражены слабее, а репаративные, напротив, протекали более активно. Отмечался рост грануляционной ткани, который был выше, чем в контрольной группе, т.е. налицо был стимулирующий эффект ФДТ.

- Можно предполагать, что ФД-активация меняет структуру фотодитазина, экранируя его общетоксическое действие. При этом диапедезные кровоизлияния (местный гистотоксический эффект) были выражены сильнее, чем в контроле, но не на много.

- Прорегенераторное действие комплексов фотодитазина с хитозаном при введении в них плюроника усиливается. Грануляционная ткань хорошо развивается. Воспалительные изменения значительно снижены по сравнению с группами 1 и 2. Однако, диапедезные кровоизлияния остаются, хотя в 4-й группе уровень диапедезных кровоизлияний на порядок меньше чем

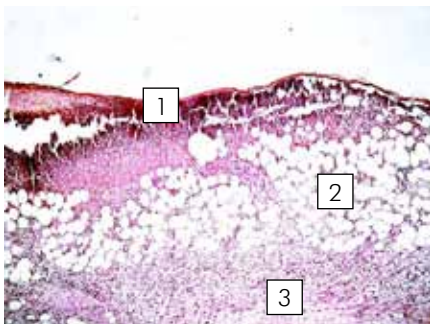


Рис. 1. II серия 1 группа (контроль) – изотонический раствор натрия хлорида+ФД-активация, 4-е сутки. Дно раны покрыто фибринозно-лейкоцитарным слоем с большим количеством разрушенных нейтрофилов (1), глубже виден слой жировой клетчатки (2), а под ним – слой грануляционной ткани (3). Окраска ГЭ, ув.х100

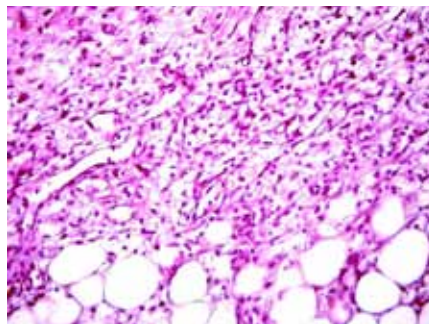


Рис. 2. II серия 1 группа (контроль) – изотонический раствор натрия хлорида+ФД-активация, 4-е сутки. Созревающая грануляционная ткань с пролиферирующими фибробластами и многочисленными новообразованными сосудами. Окраска ГЭ, ув.х400

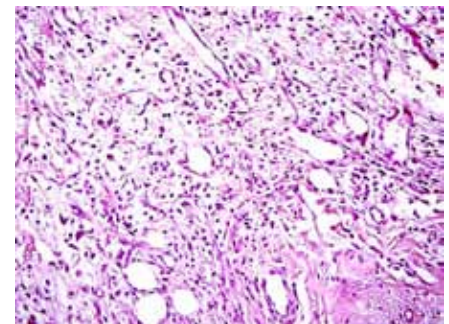


Рис. 3. 2 группа – водный раствор фотодитазина+ФД активация, 4-е сутки. Выраженный рост грануляционной ткани с большим количеством сосудов, фибробластов и макрофагов. Окраска ГЭ, ув.х400

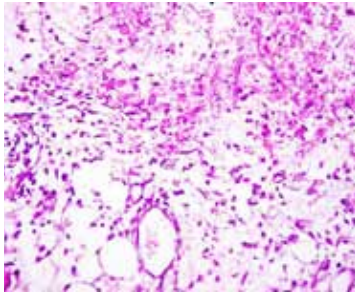


Рис. 4.
3 группа – комплекс «фотодитазин-хитозан «Биопрогресс» +ФД-активация, 4-е сут. Незрелая грануляционная ткань. Крупные очаги диапедезного кровоизлияния. Окраска ГЭ, ув.Х400

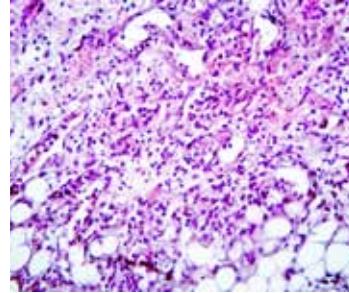


Рис. 5. 4 группа – комплекс «фотодитазин-хитозан «Биопрогресс»-плюроник+ФД активация, 4-е сутки. Развитая грануляционная ткань с большим количеством сосудов. Полнокровие сосудов. Наличие диапедезных кровоизлияний. Окраска ГЭ, ув.Х400

в группах 2 и 3.

Таким образом, при ФД-активации светодинамическим излучением развиваются те же эффекты, что и в наших прежних исследованиях,

однако присутствие плюроника в комплексе «фотодитазин-хитозан» усиливает эффективность комплексов фотодитазина при ранозаживлении.

Литература:

1. Толстых П.И. Лечение ишемических язв, развившихся на фоне атеросклероза сосудов нижних конечностей // Лазерная медицина. 2013. Т.17 № 2. С. 40-44.
2. Толстых П.И., Соловьева А.Б., Дербенев В.А., Спокойный А.Л. и др. Сравнительная эффективность лекарственных форм сенсibilизаторов, применяемых при фотодинамической терапии гнойных ран // Лазерная медицина. 2014. Т.18. № 2. С.8-12.
3. Толстых П.И., Соловьева А.Б., Спокойный А.Л. Оптимизация фотохимической терапии гной-

ных ран мягких тканей //Лазерная медицина. 2014 Т.18. №4. С.26.

4. Shekhter A.B. Beneficial effect of gaseous nitric oxide on the healing of skin wounds Nitric Oxide // Photochemistry and Photobiology. 2013. Vol. 12. №4. P.210-219.

5. Solovieva A.V., Aksenova N.A., Sorokaty A.A., A.L. Spokoiniy. Photodynamic therapy of intractable purulent wounds with photoditazine-polymer complex immobilized on hydroxyapatite nanoparticles // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2012. Vol.9. Supplement 1. P.14.

Информация об авторах:

Соловьева Анна Борисовна – заведующая лаборатории модифицированных полимерных систем института химической физики РАН, доктор химических наук, профессор.
Тел.: +79161740658, e-mail: anna@polymer.chph.ras.ru

Глаголев Николай Николаевич – старший научный сотрудник лаборатории модифицированных полимерных систем института химической физики РАН, кандидат химических наук

Аксенова Надежда Анатольевна – старший научный сотрудник лаборатории модифицированных полимерных систем института химической физики РАН, кандидат химических наук.
Тел.: +79175575797, e-mail: naksenova@mail.ru

Спокойный Александр Леонидович – младший научный сотрудник отделения хирургической инфекции ФГБУ «ГНЦ ЛМ ФМБА России»
Тел.: +79167174163, e-mail: ssanches@yandex.ru

Баранов Алексей Викторович - и.о. директора ФГБУ «ГНЦ ЛМ ФМБА России», к.м.н.
Тел.: +79166814708

Шехтер Анатолий Борисович – заведующий Лаборатории экспериментальной морфологии ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России», доктор медицинских наук, профессор,

Руденко Татьяна Георгиевна – ведущий научный сотрудник отдела коллагеновых препаратов и изделий ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, к.м.н.
Тел.: +79199937945, e-mail: t_g_rud@mail.ru