

ВЛИЯНИЕ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ С ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОМ, КОМПЛЕКСИРОВАННЫМ С АМФИФИЛЬНЫМИ ПОЛИМЕРАМИ, НА МИКРОФЛОРУ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОГНЕСТРЕЛЬНЫХ РАН

Е.Ф. Шин¹, В.И. Елисеенко¹, В.А. Дуванский^{1,2}

¹ ФГБУ «ГНЦ ЛМ им. О.К. Скобелкина ФМБА России», Москва, Россия

² Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Резюме

Цель исследования. Оценить влияние фотодинамической терапии с микрокапсулированной формой фотодитазина, комплексированного с амфифильными полимерами с гидроксиапатитом, на микрофлору экспериментальных огнестрельных ран. **Материалы и методы.** Проведен анализ эксперимента на 70 нелинейных крысах. Животные были разделены на четыре группы. В контрольной группе животных для лечения огнестрельных ран мягких тканей использовали повязки с антисептиками. В 1-й опытной группе животным на огнестрельную рану проводили сеанс лазерной фотодинамической терапии с водным раствором фотодитазина 0,5%. Во 2-й опытной группе выполняли лазерную ФДТ с 0,5% фотодитазин, комплексированным с амфифильными полимерами, в форме геля. В 3-й опытной группе выполняли лазерную ФДТ с микрокапсулированной формой фотодитазина 0,1%, комплексированного с амфифильными полимерами и гидроксиапатитом, в виде геля. Проводили микробиологические исследования. **Результаты.** Проведенные исследования показали, что на третьи сутки у крыс, огнестрельные раны которых лечили с использованием ФДТ с фотодитазин в микрокапсулированной или гелевой формах, наблюдалось более выраженное снижение микробной обсемененности раневой поверхности по сравнению с предыдущей опытной группой, и особенно контрольной. В большинстве случаев число микробных тел в 1 мл раневого отделяемого находилось в пределах 1×10^6 КОЕ, с четкой тенденцией к снижению до безопасного уровня на пятые сутки наблюдений (1×10^5 КОЕ в 1 мл раневого отделяемого) и в дальнейшем не повышалось. На десятые сутки лечения в большинстве случаев показатель микробной обсемененности раневой поверхности был значительно ниже критического уровня (1×10^4 КОЕ в 1 мл раневого отделяемого). **Заключение.** Фотодинамическая терапия с микрокапсулированной формой фотодитазина, комплексированного с амфифильными полимерами и гидроксиапатитом, оказывает выраженное антимикробное действие, способствует быстрому снижению микробной обсемененности раневой поверхности на 5-е сутки лечения до 1×10^5 КОЕ/1 мл, что ниже критического уровня.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, гнойная рана, раневая микрофлора, фотосенсибилизатор.

Контакты: Шин Евгений Федорович, e-mail: gef2048@yandex.ru

Для цитирования: Шин Е.Ф., Елисеенко В.И., Дуванский В.А. Влияние фотодинамической терапии с фотосенсибилизатором, комплексированным с амфифильными полимерами, на микрофлору экспериментальных огнестрельных ран // Лазерная медицина. – 2018. – Т. 22. – № 3. – С. 34–37

EFFECTS OF PHOTODYNAMIC THERAPY WITH PHOTOSENSITIZER COMPLEXED WITH AMPHIPHILIC POLYMERS AT THE MICROFLORA OF EXPERIMENTAL GUNSHOT WOUNDS

Shin E.F.¹, Yeliseenko V.I.¹, Duvansky V.A.^{1,2}

¹ Skobelkin State Scientific Center of Laser Medicine (SSC LM), Moscow, Russia

² Peoples' Friendship University, Moscow, Russia

Abstract

Purpose. To evaluate effects of photodynamic therapy with microencapsulated form of Photoditazine, complexed with amphiphilic polymers with hydroxyapatite, at the microflora of experimental gunshot wounds. **Materials and methods.** 70 nonlinear rats were in the experiment. The animals were divided into four groups. In the control group, dressings with antiseptics were used to treat soft-tissue gunshot wounds. In the experimental Group 1, laser PDT session with aqueous solution of 0.5% Photoditazine on a gunshot wound was made. In the experimental Group 2, laser PDT session with 0.5% Photoditazine complexed with amphiphilic polymers in a gel form was made. In the experimental Group 3, laser PDT session with gel, microencapsulated form of 0.1% Photoditazine complexed with amphiphilic polymers and hydroxyapatite was performed. Microbiological testing was made too. **Results.** The conducted studies showed that on the third day, microbial contamination on gunshot wound surface which was treated with PDT plus Photoditazine in microencapsulated or gel form, was much less comparing to another experimental group and, especially, to the control group. In most cases, the number of microbial bodies in 1 ml of wound secretion was 1×10^6 CFU with a clear tendency to decrease to the safe level on the fifth day of observations (1×10^5 CFU in 1 ml of wound secretion) and did not increase thereafter. On day 10 of the treatment, index of microbial contamination on wound surface was significantly lower, in most cases, than the critical level (1×10^4 CFU in 1 ml of wound secretion). **Conclusion.** Photodynamic therapy with microencapsulated form of Photoditazine complexed with amphiphilic polymers and hydroxyapatite has a pronounced antimicrobial effect, contributes to a rapid decrease in microbial contamination of the wound surface on the 5th day of treatment up to 1×10^5 CFU/1 ml which is below the critical level.

Keywords: photodynamic therapy, purulent wound, wound microflora, photosensitizer.

Contacts: Eugeny Shin, e-mail: gef2048@yandex.ru

For citation: Shin E.F., Yeliseenko V.I., Duvansky V.A. Effects of photodynamic therapy with photosensitizer complexed with amphiphilic polymers at the microflora of experimental gunshot wounds. *J. Laser Medicine*. 2018; 22 (3): 34–37 (in Russian)

Введение

В настоящее время в России, так же, как и во всем мире, интенсивно развивается новая технология — фотодинамическая терапия (ФДТ) [9]. Данная технология

может применяться во множестве различных областей медицины, в том числе и в гнойной хирургии [1, 17]. Результаты исследований последних лет показали, что ФДТ не только не замедляет заживление раневых дефектов

различного генеза, но и вызывает их ускоренную регенерацию и стимулирует микроциркуляцию [2, 3, 13, 15].

Фотодинамическая терапия имеет ряд преимуществ перед традиционной антибактериальной терапией. Эффективность ФДТ не зависит от спектра чувствительности патогенных микроорганизмов к антибиотикам, была выявлена ее эффективность в отношении антибиотикорезистентных штаммов золотистого стафилококка, кишечной палочки и целого ряда других микроорганизмов [12, 16]. У патогенных микроорганизмов, в отличие от воздействия на них антибиотиков, не развивается резистентность к фотодинамической терапии. Фотодинамическое повреждение носит локальный характер, а бактерицидный эффект лимитируется зоной лазерного облучения фотосенсибилизированной ткани [11, 14].

ФДТ с фотосенсибилизаторами (ФС) первого поколения доказала свое положительное воздействие на течение раневого процесса, что проявляется в выраженном антибактериальном действии, ускорении очищения ран от гнойно-некротического детрита, стимуляции репаративного процесса [4]. Однако ФС первого поколения имеют ряд существенных недостатков, таких как длительный период полувыведения из организма, достаточно часто возникающие аллергические реакции и значительное повышение фоточувствительности всего организма на длительный промежуток времени. ФС второго поколения лишены этих недостатков. В настоящее время наиболее перспективными являются фотосенсибилизаторы на основе солей хлорина Е6 [10]. Как наиболее часто встречающийся в клинической практике фотосенсибилизатор этой группы, нами был выбран для использования в нашем исследовании препарат фотодитазин [5]. В Институте химической физики имени Н.Н. Семенова РАН была предложена лекарственная форма препарата для ФДТ опухолей, гнойных, ожоговых и огнестрельных ран, предусматривающая локальное использование ФС, в том числе фотодитазина, иммобилизованного на амфифильном полимерном носителе (патент РФ № 2314806) [6], что позволяет значительно снизить лекарственную дозу ФС и улучшить лечебный эффект, повышая биологическую доступность препарата [7, 8].

При ФДТ гнойных ран была выявлена различная эффективность лечения в зависимости от бактериальной флоры, высеваемой из раневого содержимого. Необходимость исследования влияния фотодинамической терапии на течение раневого процесса, вызванного различными группами бактериальной флоры, очевидна для всех исследователей данного направления.

Цель исследования – оценить влияние фотодинамической терапии с микрокапсулированной формой фотодитазина, комплексированного с амфифильными полимерами с гидроксипатитом, на микрофлору экспериментальных огнестрельных ран.

Материалы и методы

Экспериментальные исследования были нами выполнены на 70 нелинейных крысах массой 250 ± 20 г, в соответствии с приказом № 755 МЗ СССР от 12.08.77 г. Животные содержались в одинаковых условиях виварного режима и прошли карантинный отбор.

В соответствии с целью и задачами исследования животные были разделены на четыре группы.

В контрольной группе животных (10 крыс) для лечения огнестрельных ран мягких тканей использовали повязки с антисептиками.

В 1-й опытной группе животным (20 крыс) на огнестрельную рану проводили сеанс лазерной фотодинамической терапии с водным раствором фотодитазина 0,5%.

Во 2-й опытной группе (20 крыс) выполняли ФДТ с фотодитaziном 0,5%, комплексированным с амфифильными полимерами, в форме геля.

В 3-й опытной группе (20 крыс) выполняли ФДТ с микрокапсулированной формой фотодитазина 0,1%, комплексированного с амфифильными полимерами и гидроксипатитом, в форме геля.

Гель фотодитазина был нами получен в Институте химической физики РАН методом комплексообразования лекарственного средства с амфифильными полимерами. Микрокапсулы на основе гидроксипатита (ГАП) изготовлены по методике Ф.Е. Шина (2004) [11] с использованием эффекта несмешивающихся жидкостей. Полученный таким образом порошок белого цвета содержал гранулы ГАП диаметром 200–300 мкм и открытой пористостью 35–40%, которые в дальнейшем путем применения метода вакуумирования иммобилизовывались гелем фотодитазина, комплексированного с амфифильными полимерами.

При лечении экспериментальных огнестрельных ран мягких тканей у крыс с использованием ФДТ придерживались следующей тактики. Лечебные мероприятия начинали через сутки после нанесения огнестрельной раны. Вначале проводили первичную хирургическую обработку ран. Она заключалась в рассечении раневого канала без иссечения видимых некротических тканей. Раневые каналы животных промывали растворами антисептиков и затем тампонируют марлевой салфеткой, смоченной раствором фотосенсибилизатора 0,5% в растворе димексида 25%, или с фотосенсибилизатором в форме геля. Через 2 часа экспозиции салфетку удаляли, а раневую поверхность обрабатывали лазерным излучением. Использовали плотность мощности 1 Вт/см², плотность энергии 50 Дж/см². Для фотодинамической терапии ран применяли аппарат «АКТУС-2», длина волны излучения $661 \pm 0,03$ нм (изготовитель ЗАО «Полупроводниковые приборы», г. Санкт-Петербург). По окончании процедуры рану промывали растворами антисептиков и затем тампонируют салфетками с антисептиками. Лечение после очищения ран осуществляли применением мазевых повязок. Перевязки животным производили ежедневно до перехода раневого процесса во вторую фазу заживления.

Забор материала для исследований у крыс выполняли в первые сутки и последовательно на третьи, пятые и десятые сутки наблюдений. Животных из опыта выводили методом декапитации.

С целью выявления влияния использованных методик лечения на микробную обсемененность огнестрельных ран мягких тканей у крыс выполнили микробиологические исследования. Количественный бактериальный контроль обсеменения изучали на третьи, пятые и деся-

тые сутки с момента начала лечения методом E.D. Ro-theram (1975).

Результаты и обсуждение

По результатам наших исследований установлено, что через 24 часа после травмы перед началом лечения огнестрельная рана во всех группах сравнения представляет собой очаг острого гнойного воспаления со степенью микробной обсемененности $1 \times 10^{9-10}$ КОЕ/мл раневого отделяемого.

Применяемые методы лечения огнестрельных ран мягких тканей по-разному влияли на микробную обсемененность. Установлено, что существенных различий в степени микробной обсемененности раневой поверхности при использовании ФДТ с фотодитазиним, комплексированным с амфифильными полимерами в микрокапсулированной или гелевой формах, не выявлено (рис.).

Результаты микробиологических исследований показали, что на третьи сутки лечения в контрольной группе животных число микробных тел продолжает оставаться на изначально высоком уровне, в большинстве случаев она была в пределах $1 \times 10^{9-10}$ КОЕ в 1 мл раневого отделяемого.

Некоторая тенденция к уменьшению исследуемого показателя при традиционном лечении огнестрельных ран мягких тканей выявлялась лишь к исходу пятых суток наблюдений. В данный срок лечения степень микробной обсемененности раневой поверхности находилась в пределах 1×10^7 КОЕ в 1 мл раневого отделяемого. Несмотря на проводимую терапию, уровень микробной обсемененности раневой поверхности продолжал оставаться высоким и в последующие сроки исследования. На десятые сутки наблюдений он оставался на уровне 1×10^7 КОЕ в 1 мл раневого отделяемого.

На третьи сутки лечения в первой опытной группе (лечение с использованием ФДТ с водным раствором фотодитазина 0,5%) микробная обсемененность раневой поверхности снижалась до 1×10^7 КОЕ в 1 мл раневого отделяемого. Изучение микробной обсемененности экспериментальных огнестрельных ран мягких тканей, проведенное на пятые сутки лечения, выявило четкую тенденцию к снижению числа микробных тел – в большинстве случаев показатель был на уровне 1×10^6 КОЕ в

1 мл раневого отделяемого. Безопасный уровень микробной обсемененности раневой поверхности наблюдался к исходу десятых суток лечения, не выше 1×10^5 КОЕ в 1 мл раневого отделяемого.

Проведенные исследования показали, что на третьи сутки у крыс, огнестрельные раны которых лечили с использованием ФДТ с фотодитазиним в микрокапсулированной или гелевой формах, наблюдалось более выраженное снижение микробной обсемененности раневой поверхности по сравнению с предыдущей опытной группой, и особенно контрольной. В большинстве случаев число микробных тел в 1 мл раневого отделяемого находилось в пределах 1×10^6 КОЕ, с четкой тенденцией к снижению до безопасного уровня на пятые сутки наблюдений (1×10^5 КОЕ в 1 мл раневого отделяемого) и в дальнейшем не повышалось. На десятые сутки лечения в большинстве случаев показатель микробной обсемененности раневой поверхности был значительно ниже критического уровня (1×10^4 КОЕ в 1 мл раневого отделяемого).

Таким образом, ФДТ с использованием фотодитазина в различных лекарственных формах положительно влияет на степень микробной обсемененности экспериментальных огнестрельных ран мягких тканей. Местное лечение огнестрельных ран с использованием ФДТ с фотодитазиним в форме водного раствора 0,5%, в отличие от контрольных животных, обеспечивает возможность снижения уровня микробной обсемененности раневой поверхности к десятым суткам наблюдений. В то же время ФДТ с фотодитазиним, комплексированным с амфифильными полимерами в гелевой или микрокапсулированной формах, характеризуется более выраженным антимикробным действием по сравнению с водным раствором лекарственного препарата. В случае лечения экспериментальных огнестрельных ран с использованием ФДТ с фотодитазиним в упомянутых формах уже на пятые сутки наблюдений выявляется снижение микробной обсемененности раневой поверхности до 1×10^5 КОЕ в 1 мл раневого отделяемого.

Заключение

Фотодинамическая терапия с микрокапсулированной формой фотодитазина, комплексированного с амфифиль-

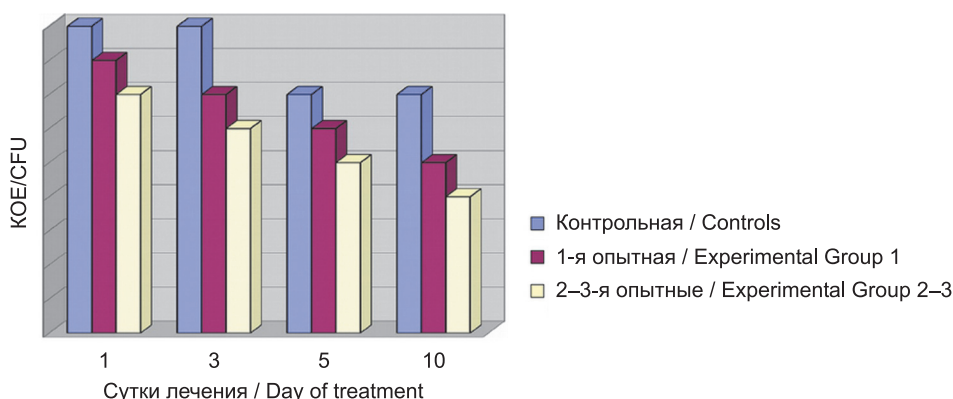


Рис. Микробная обсемененность экспериментальных огнестрельных ран мягких тканей

Fig. Microbial contamination of experimental gunshot wounds in soft tissues

ными полимерами и гидроксипатитом, оказывает выраженное антимикробное действие, способствует быстрому снижению микробной обсемененности раневой поверхности на 5-е сутки лечения до 1×10^5 КОЕ/мл, что ниже критического уровня.

Литература

1. Буравский А.В., Баранов Е.В., Третьяк С.И. Целесообразность использования комбинированной локальной светодиодной фототерапии в лечении пациентов с наружными раневыми дефектами // Медицинский журнал. – 2016. – № 1 (55). – С. 86–92.
2. Дуванский В.А., Попова Е.А. Первый опыт применения фотодинамической терапии в комплексном лечении дуоденальных язв // Лазерная медицина. – 2004. – Т. 8. – № 3. – С. 138.
3. Дуванский В.А., Елисеенко В.И. Эндоскопическая фотодинамическая терапия дуоденальных язв // Лазерная медицина. – 2006. – Т. 10. – № 2. – С. 10–14.
4. Корабаев У.М., Тепляшин А.С., Странадко Е.Ф. и др. Способ лечения гнойных заболеваний мягких тканей с использованием фотосенсибилизатора «Фотосенс» и источников света – лазерного и нелазерного // Лазерная медицина. – 1999. – Т. 3. – № 3–4. – С. 80–82.
5. Кулешов И.Ю., Шин Е.Ф. Исследование возможностей фотодинамической терапии при лечении гнойных, ожоговых и огнестрельных ран у крыс в эксперименте // Теоретические и практические аспекты фотодинамической терапии ран различного генеза. Прологомены / Под ред. П.И. Толстых, Э.В. Луцевича. – М.: Альтаир, 2012. – С. 71–154.
6. Патент RU № 2530589 Российской Федерации на изобретение «Средство для лечения гнойных ран, способ его получения и способ лечения гнойных ран» // Толстых П.И., Сорокаты А.А., Соловьева А.Б. и др. Опубликовано 10.10.2014. Бюллетень № 28. – С. 7–10.
7. Сорокаты А.А. Фотохимическая терапия гнойных ран комплексом «Фотодитазин» – амфифильный полимер: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2011. – 20 с.
8. Соловьева А.Б., Спокойный А.Л., Руденко Т.Г. и др. Влияние водорастворимых полимеров на активность фотодитазина при фотодинамической терапии гнойных ран мягких тканей в эксперименте // Клиническая практика. – 2016. – № 2. – С. 43–48.
9. Странадко Е.Ф. Фотодинамическая терапия – новая медицинская технология лечения рака и неопухолевых заболеваний // Российский биотерапевтический журнал. – 2016. – Т. 15. – № 1. – С. 104–105.
10. Толстых П.И., Соловьева А.Б., Дербенев В.А. и др. Сравнительная эффективность лекарственных форм сенсибилизаторов, применяемых при фотодинамической терапии гнойных ран // Лазерная медицина. – 2014. – Т. 18. – № 2. – С. 8–12.
11. Шин Е.Ф., Дуванский В.А., Елисеенко В.И. Фотодинамическая терапия экспериментальных огнестрельных ран мягких тканей // Лазерная медицина. – 2017. – Т. 21. – № 1. – С. 33–38.
12. Katayama B., Ozawa T., Morimoto K. et al. Enhanced sterilization and healing of cutaneous pseudomonas infection using 5-aminolevulinic acid as a photosensitizer with 410-nm LED light. *J. Dermatol. Sci.* 2018 Jun; 90 (3): 323–331.
13. Mendoza-Garcia J., Sebastian A., Alonso-Rasgado T., Bayat A. Optimization of an ex vivo wound healing model in the adult human skin: Functional evaluation using photodynamic therapy. *Wound Repair Regen.* 2015 Sep; 23 (5): 685–702.
14. Percival S.L., Suleman L., Francolini I., Donelli G. The effectiveness of photodynamic therapy on planktonic cells and biofilms and its role in wound healing. *Future Microbiol.* 2014; 9 (9): 1083–1094.
15. Torchinov A.M., Umakhanova M.M., Duvansky R.A. et al. Photodynamic therapy of background and precancerous diseases of uterine cervi with photosensitisers of chlorine raw. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 2008; 5 (S1): 45.
16. Ullah A., Zhang Y., Iqbal Z. et al. Household light source for potent photo-dynamic antimicrobial effect and wound healing in an infective animal model. *Biomed. Opt. Express.* 2018 Feb 6; 9 (3): 1006–1019.
17. Wang C., Huang S., Zhu T. et al. Efficacy of photodynamic antimicrobial therapy for wound flora and wound healing of pressure sore with pathogen infection. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2014 Aug 19; 94 (31): 2455–2459.

References

1. Buravsky A.V., Baranov E.V., Tretyak S.I. Reasonability in using combined local LED phototherapy in the treatment of patients with external wound defects. *Medical Journal.* 2016; 1 (55): 86–92.
2. Duvansky V.A., Popova E.A. The first experience of using photodynamic therapy in the complex treatment of duodenal ulcers. *J. Laser Medicine.* 2004; 8 (3): 138.
3. Duvansky V.A., Yeliseenko V.I. Endoscopic photodynamic therapy in duodenal ulcers. *J. Laser Medicine.* 2006; 10 (2): 10–14.
4. Korabaev U.M., Teplyashin A.S., Stranadko E.Ph. et al. A technique for treatment purulent soft tissue diseases with photosensitizer Photosense and light sources – laser and non-laser. *J. Laser Medicine.* 1999; 3 (3–4): 80–82.
5. Kuleshov I.Yu., Shin E.F. Effects of photodynamic therapy in treating purulent, burn and gunshot wounds in rats in the experiment. *Theoretical and practical aspects of photodynamic therapy in wounds of various genesis. Prolegomena.* (Ed: P.I. Tolstykh, E.V. Lucevich). Moscow: Altair, 2012: 71–154.
6. Patent RU No. 2530589 of the Russian Federation for the invention «An agent for treating purulent wounds; a method of its preparation and a technique for treating purulent wounds». Tolstykh P.I., Sorokaty A.A., Solovieva A.B. and others. Published on 10/10/2014, Bulletin No. 28 pp 7–10.
7. Sorokaty A.A. Photochemical therapy of purulent wounds by the complex «Photoditazine – amphiphilic polymer». Author's abstract. Dissertation for Cand. Med. Sc. Moscow, 2011: 20.
8. Solovieva A.B., Spokoyny A.L., Rudenko T.G. et al. Influence of water-soluble polymers at Photoditazine activity in photodynamic therapy of purulent wounds of soft tissues in experiment. *Clinical Practice.* 2016; 2: 43–48.
9. Stranadko E.Ph. Photodynamic therapy is a new medical technology for treating cancer and non-tumor diseases. *Russian Biotherapeutic Journal.* 2016; 15 (1): 104–105.
10. Tolstykh P.I., Solovieva A.B., Dербенев V.A. et al. Comparative effectiveness of medicinal forms of sensitizers used in the photodynamic therapy of purulent wounds. *J. Laser Medicine.* 2014; 18 (2): 8–12.
11. Shin E.F., Duvansky V.A., Yeliseenko V.I. Photodynamic therapy of experimental gunshot wounds of soft tissues. *J. Laser Medicine.* 2017; 21 (1): 33–38.
12. Katayama B., Ozawa T., Morimoto K. et al. Enhanced sterilization and healing of cutaneous pseudomonas infection using 5-aminolevulinic acid as a photosensitizer with 410-nm LED light. *J. Dermatol. Sci.* 2018 Jun; 90 (3): 323–331.
13. Mendoza-Garcia J., Sebastian A., Alonso-Rasgado T., Bayat A. Optimization of an ex vivo wound healing model in the adult human skin: Functional evaluation using photodynamic therapy. *Wound Repair Regen.* 2015 Sep; 23 (5): 685–702.
14. Percival S.L., Suleman L., Francolini I., Donelli G. The effectiveness of photodynamic therapy on planktonic cells and biofilms and its role in wound healing. *Future Microbiol.* 2014; 9 (9): 1083–1094.
15. Torchinov A.M., Umakhanova M.M., Duvansky R.A. et al. Photodynamic therapy of background and precancerous diseases of uterine cervi with photosensitisers of chlorine raw. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 2008; 5 (S1): 45.
16. Ullah A., Zhang Y., Iqbal Z. et al. Household light source for potent photo-dynamic antimicrobial effect and wound healing in an infective animal model. *Biomed. Opt. Express.* 2018 Feb 6; 9 (3): 1006–1019.
17. Wang C., Huang S., Zhu T. et al. Efficacy of photodynamic antimicrobial therapy for wound flora and wound healing of pressure sore with pathogen infection. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2014 Aug 19; 94 (31): 2455–2459.