

УДК 616-001.45-616-72

ВЛИЯНИЕ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ С ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОМ, КОМПЛЕКСИРОВАННЫМ С АМФИФИЛЬНЫМИ ПОЛИМЕРАМИ, НА РЕПАРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ 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, Россия² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Резюме

Цель: оценить эффективность фотодинамической терапии с фотосенсибилизатором фотодитазин, комплексированным с амфифильными полимерами, в лечении экспериментальных огнестрельных ран мягких тканей. **Материал и методы.** Проведены экспериментальные исследования на 50 нелинейных крысах, разделенных на 3 группы в зависимости от метода лечения: контрольная – традиционное лечение; 1-я опытная – ФДТ с фотодитазин в форме водного раствора 0,5%; 2-я опытная – ФДТ с комплексом «микрокапсулированный фотодитазин 0,1% – амфифильный полимер». Для ФДТ ран применяли аппарат «АКТУС-2» отечественного производства. Длина волны лазерного излучения $661 \pm 0,03$ нм. Использовали плотность мощности лазерного излучения 1 Вт/см². Плотность энергии составляла 50 Дж/см². Выполнен анализ данных, полученных на основании цитологических и гистологических исследований. **Результаты.** Через 10 суток во 2-й опытной группе после ФДТ в мазках-отпечатках определяли картину активной пролиферации, а также дифференцирование элементов репарации. Отмечали увеличение числа мононуклеарных элементов до $9,4 \pm 0,8\%$, а также общего количества юных и зрелых фибробластов. По сравнению с таковыми предыдущих групп сравнения в раневом экссудате насчитывалось в два раза больше клеточных элементов репарации, отмечалось отсутствие дегенеративно измененных нейтрофилов. ФДТ с фотодитазин, комплексированным с амфифильными полимерами, купирует расстройства системы микроциркуляции, активизирует альтернативно-экссудативную фазу воспаления. При этом в зоне сотрясения происходит ограничение развития вторичных некрозов и восстановление жизнеспособности поврежденных тканей. **Заключение.** ФДТ с комплексом «микрокапсулированный фотодитазин – амфифильный полимер» экспериментальных огнестрельных ран мягких тканей приводит к быстрому восстановлению жизнеспособности поврежденных тканей в зоне сотрясения, раннему развитию процессов репарации, выраженной активации макрофагов, стимуляции ангиогенеза и коллагеногенеза, ускорению рубцевания и эпителизации раневого дефекта.

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

Для цитирования: Шин Е.Ф., Елисеенко В.И., Дуванский В.А. Влияние фотодинамической терапии с фотосенсибилизатором, комплексированным с амфифильными полимерами, на репаративные процессы экспериментальных огнестрельных ран // Лазерная медицина. – 2019. – Т. 23. – Вып. 3. – С. 50–54.

Контакты: Шин Е.Ф., e-mail: gef2018@yandex.ru

EFFECTS OF PHOTODYNAMIC THERAPY WITH A PHOTOSENSITIZER COMPLEXED WITH AMPHIPHILIC POLYMERS AT REPARATIVE PROCESSES IN EXPERIMENTAL GUNSHOT WOUNDS

Shin E.F.¹, Yeliseenko V.I.¹, Duvansky V.A.^{1,2}¹ Skobelkin State Scientific Center of Laser Medicine, Moscow, Russia² Peoples' Friendship University, Moscow, Russia

Abstract

Purpose: To assess the effectiveness of photodynamic therapy (PDT) with photosensitizer Photoditazine complexed with amphiphilic polymers in the treatment of experimental gunshot wounds of soft tissues. **Material and methods.** Experimental studies were conducted on 50 non-linear rats, divided into 3 groups, depending on the curative modality: controls – traditional treatment; experimental Group 1 – PDT with Photoditazine in the form of 0.5% aqueous solution; experimental Group 2 – PDT with the complex of microencapsulated Photoditazine 0.1% – amphiphilic polymer. To treat wounds with PDT, AKTUS-2 device of Russian production was used. Wavelength of laser irradiation 661 ± 0.03 nm; power density 1 W/cm²; energy density 50 J/cm². Findings obtained after cytological and histological examinations were analyzed by the authors. **Results.** In 10 days after PDT, smears showed active proliferation as well as differentiation of reparation elements in Group 2. The increase of mononuclear elements up to $9.4 \pm 0.8\%$ and of the total number of young and mature fibroblasts were noted as well. If to compare these parameters with previous comparison groups, wound exudate contained twice more cellular reparation elements, and there were no degeneratively altered neutrophils. PDT with Photoditazine complexed with amphiphilic polymers stops disorders in the microcirculation system and activates the alternative-exudative phase of inflammation. Moreover, in the concussion zone, development of secondary necroses is limited, and the viability of damaged tissues is restored. **Conclusion.** PDT with a complex of microencapsulated Photoditazine and amphiphilic polymer leads to a quick restoration of viability in damaged tissues in the concussion zone, to early development of reparation processes, to expressed macrophage activation, to stimulation of angiogenesis and collagenogenesis as well as to the accelerated scarring and epithelization of wound defects in experimental gunshot wounds of soft tissues.

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

For citation: Shin E.F., Yeliseenko V.I., Duvansky V.A. Effects of photodynamic therapy with a photosensitizer complexed with amphiphilic polymers at reparative processes in experimental gunshot wounds. *Lasernaya Medicina*. 2019; 23 (3): 50–54. [In Russ.].

Contacts: Shin E.F., e-mail: gef2018@yandex.ru

Введение

Перспективной технологией лечения гнойных ран мягких тканей, в частности огнестрельных ран, является

фотодинамическая терапия (ФДТ) с различными фотосенсибилизаторами. ФДТ отличается от традиционных методов лечения гнойных ран целым рядом свойств:

высокая избирательность действия, высокая антибактериальная активность, возможность повторения процедуры, отсутствие местных осложнений [3, 8, 9].

Фотосенсибилизаторы (ФС) первого поколения имеют целый ряд недостатков, из-за которых возможно повреждение здоровых тканей при проведении фотодинамической терапии [5]. В последние годы созданы ФС, обладающие низкой токсичностью, высокой селективностью накопления фотосенсибилизаторов в пораженных тканях и органах, быстрым выведением из организма, низкой терапевтической дозой вводимых препаратов [1, 6, 7]. Несмотря на перечисленные положительные эффекты ФДТ, работы по применению данной технологии в лечении ран мягких тканей различного генеза с ФС нового поколения и изучению ее влияния на репаративные процессы немногочисленны [2, 4].

Цель исследования: оценить эффективность фотодинамической терапии с фотосенсибилизатором фотодитазин, комплексированным с амфифильными полимерами, в лечении экспериментальных огнестрельных ран мягких тканей.

Материал и методы

Экспериментальные исследования выполнены на 50 нелинейных крысах и проведены в соответствии с приказом № 755 МЗ СССР от 12.08.77 г. Животные были разделены на три группы (табл.).

Комплекс «микрокапсулированный фотодитазин 0,1% – амфифильный полимер» был разработан в Институте химической физики РАН. Для его производства использовали метод комплексообразования лекарственного средства с амфифильными полимерами. Микрокапсулы на основе гидроксиапатита (ГАП) изготовлены по методике Ф.Е. Шина (2004) 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.

Для лечения экспериментальных огнестрельных ран мягких тканей с использованием ФДТ придерживались следующей тактики: животным наносили огнестрельную рану, лечебные мероприятия начинали через сутки после этого. Проводили первичную хирургическую обработку ран. Она включала рассечение раневого канала без иссечения видимых некротических тканей. Раневые каналы промывали растворами антисептиков. Затем

рану тампонируют марлевой салфеткой, смоченной раствором фотосенсибилизатора фотодитазина в форме водного раствора 0,5%.

Во 2-й опытной группе ФС был в форме геля. Через 2 часа экспозиции салфетку удаляли, а раневую поверхность обрабатывали лазерным излучением. Использовали плотность мощности лазерного излучения 1 Вт/см². Плотность энергии составляла 50 Дж/см². Для ФДТ ран применяли аппарат «АКТУС-2» отечественного производства. Длина волны лазерного излучения $661 \pm 0,03$ нм (изготовитель ЗАО «Полупроводниковые приборы», г. Санкт-Петербург).

Забор материала для исследований выполняли в первые сутки, а также на 3-и, 5-е и 10-е сутки наблюдений. Из опыта животных выводили методом декапитации.

Для оценки цитологических исследований использовали метод мазков-отпечатков раневой поверхности, разработанный М.П. Покровской и М.С. Макаровой (1942). Проводили морфологический анализ участков раневой поверхности. Их забор осуществляли методом иссечения. Гистологические исследования тканей из области канала огнестрельной раны проводили на 3-и, 5-е и 10-е сутки наблюдений. Срезы, их толщина 5–7 мкм, окрашивали гематоксилином-эозином. Коллагеновые волокна красили пикрофуксином по Ван-Гизону, эластические волокна – фуксилином. Для выявления аргирофильных структур препараты импрегнировали серебром по Гомори. Также использовали гистохимические методы.

Результаты

Цитологические исследования показали, что до начала лечения раневой экссудат экспериментальных огнестрельных ран мягких тканей характеризовался однородностью клеточного состава. Превалирующими клеточными элементами в мазках-отпечатках были нейтрофильные лейкоциты в стадии дегенеративных изменений и распада. Обращало на себя внимание большое количество свободнолежащих микроорганизмов, нитей фибрина и детрита, а также небольшое количество незрелых мононуклеарных элементов. Отмечали их неспособность к активному фагоцитозу. Явления внутриклеточного незавершенного фагоцитоза бактерий нейтрофилами были выражены слабо.

В мазках-отпечатках контрольной группы животных на 5-е сутки лечения (рис. 1) выявлены признаки выраженного воспалительного процесса, определялись нейтрофильные лейкоциты, как неизменные, так и в

Таблица

Распределение животных по группам

Table

Distribution of animals by groups

Группа Group	Метод лечения Treatment method	Количество Quantity
Контрольная Controls	Растворы антисептиков, мазевые повязки Antiseptic solutions, ointment bandages	10
1-я опытная Experimental Group 1	ФДТ с фотодитазин в форме водного раствора 0,5% PDT with photoditazine in the form of an aqueous solution of 0,5%	20
2-я опытная Experimental Group 2	ФДТ с комплексом «микрокапсулированный фотодитазин 0,1% – амфифильный полимер» PDT with a complex of “microencapsulated Photoditazine 0.1% – amphiphilic polymer”	20

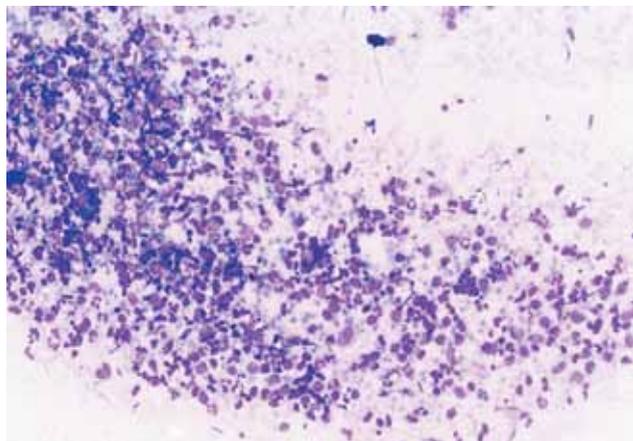


Рис. 1. Цитологическая картина огнестрельной раны крыс контрольной группы на 5-е сутки наблюдений. Окраска азур-II-эозином. $\times 280$

Fig. 1. Cytological picture of rat's gunshot wound in the control group on the 5th observational day. Staining: azur-II-eosin. $\times 280$

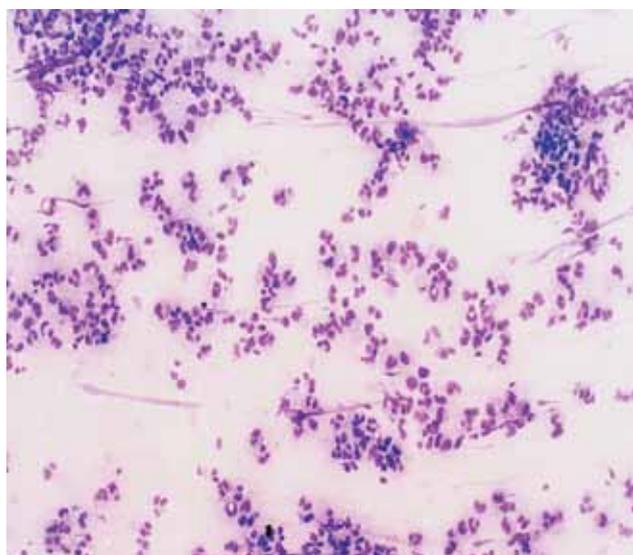


Рис. 2. Цитологическая картина экспериментальной огнестрельной раны. 2-я группа, 5-е сутки лечения. Окраска азур-II-эозином. $\times 280$

Fig. 2. Cytological picture of an experimental gunshot wound. Group 2, the fifth day of treatment. Staining: azur-II-eosin. $\times 280$

состоянии распада и дегенеративного изменения ($17,9 \pm 0,3\%$). Они располагались среди большого количества свободнолежащих микроорганизмов, а также нитей фибрина. Клетки последних были фрагментированы, а цитоплазма характеризовалась полихромазией, кариолизисом и кариорексисом. Неизменные нейтрофилы имели нормальное сегментированное ядро и неразрушенную цитоплазму без признаков дистрофии. Встречались единичные мононуклеарные элементы и макрофаги. Их количество не превышало $0,8 \pm 0,9$ и $0,9 \pm 0,4\%$ соответственно. Это свидетельствовало о превалировании воспалительных явлений над репаративными.

У животных 1-й опытной группы в раневом экссудате на 5-е сутки лечения нейтрофильные лейкоциты были доминирующими клеточными элементами – не менее

$77,1 \pm 1,1\%$. Отмечали свободнолежащие микроорганизмы, а также фибрин и дегенеративно измененные клетки. Они обнаруживались в меньших количествах по сравнению с контрольной группой ($8,9 \pm 0,1\%$, $p < 0,05$). Уровень содержания незрелых мононуклеарных клеток и макрофагов одновременно с этим был более высоким ($3,6 \pm 1,2$ и $4,6 \pm 0,3\%$ соответственно, $p < 0,05$). В данной группе животных уже в эти ранние сроки наблюдения отмечалась положительная динамика. В мазках-отпечатках раневой поверхности крыс определялись единичные юные фибробласты. Их количество составило до $1,2 \pm 0,3\%$.

У крыс 2-й опытной группы на пятые сутки лечения по сравнению с вышеописанными группами отмечали следующее: снижение общего содержания нейтрофилов, значительно меньшее количество дегенеративно измененных нейтрофилов (не более $8,3 \pm 0,2\%$, $p < 0,05$), колоний микроорганизмов и нитей фибрина. В этот период в цитограммах отмечено увеличение процента мононуклеарных фагоцитов – от $5,1 \pm 0,3$ до $5,4 \pm 0,4\%$, количества макрофагов – от $4,3 \pm 0,1$ до $4,9 \pm 0,2\%$. Наряду с юными фибробластами ($2,5 \pm 0,2\%$) встречались и зрелые фибробласты ($0,7 \pm 0,3\%$), что свидетельствовало о купировании воспалительной реакции, а также об активации процессов репарации у крыс 2-й опытной группы (рис. 2).

Через 10 суток с момента начала лечения в контрольной группе животных выявлено вялое очищение огнестрельных ран от микрофлоры. В мазках-отпечатках определяли значительное количество свободно лежащих микроорганизмов, нитей фибрина и дегенеративно измененных нейтрофилов ($19,8 \pm 0,3\%$). Статистически достоверно увеличивалось количество нейтрофилов в стадии активного фагоцитоза ($69,9 \pm 0,7\%$) по сравнению с предыдущим сроком исследования. Число мононуклеарных элементов ($2,4 \pm 0,7\%$) и макрофагов ($2,5 \pm 0,8\%$) увеличилось незначительно. Однако одновременно с этим в раневом экссудате выявлялись единичные юные фибробласты. Их количество было $1,5 \pm 0,2\%$. В целом воспалительная реакция была выраженная. Дифференцировка и нарастание числа клеток репарации были замедленными.

В опытных группах животных отмечали дальнейшее уменьшение количества свободнолежащих микроорганизмов, а также фибрина и распавшихся нейтрофилов. Так, в 1-й опытной группе животных количество нейтрофилов было $5,9 \pm 0,3\%$ ($p < 0,05$). Наблюдалась активная пролиферация юных и зрелых фибробластов (до $2,7\%$).

Во 2-й опытной группе в мазках-отпечатках отмечали картину активной пролиферации, а также дифференцирование элементов репарации. Отмечали увеличение числа мононуклеарных элементов до $9,4 \pm 0,8\%$, а также общего количества юных и зрелых фибробластов. По сравнению с таковыми предыдущих групп сравнения в раневом экссудате насчитывалось в два раза больше клеточных элементов репарации. Отмечали отсутствие в раневом экссудате дегенеративно измененных нейтрофилов.

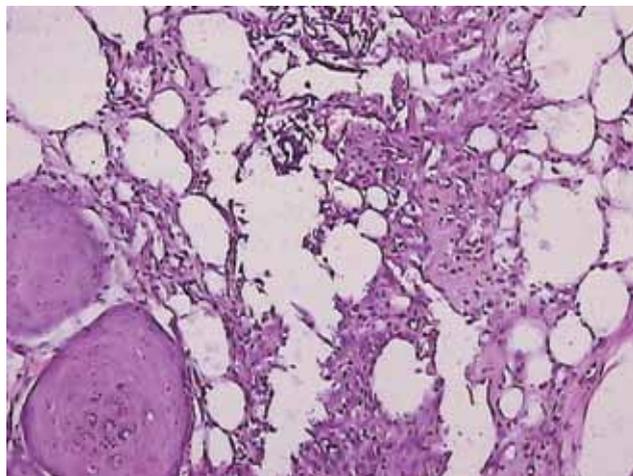


Рис. 3. Фрагменты некротизированных мышечных волокон на границе первичного раневого канала и зоны сотрясения. Контрольная группа. 3-и сутки лечения. Окр. гематоксилином и эозином. $\times 180$

Fig. 3. Fragments of necrotic muscle fibers. On the border of primary wound canal and concussion zone. Control group. Day 3, treatment. Staining: hematoxylin and eosin. $\times 180$

Цитологические исследования показали, что применение ФДТ с фотодитазином, комплексированным с амфифильными полимерами (2-я опытная группа), в большей степени активизирует репаративные процессы по сравнению с ФДТ с фотодитазином в форме водного раствора (1-я опытная группа).

По данным гистологических исследований установлено, что в контрольной группе животных заживление экспериментальных огнестрельных ран мягких тканей происходит медленнее. Оно характеризуется резко выраженными дистрофическими и некротическими изменениями, а также воспалительными изменениями, которые развиваются на фоне выраженных микроциркуляторных расстройств (рис. 3). Это служит причиной формирования обширной зоны сотрясения и вторичного некроза поврежденной ткани. А в последующем характеризуется вялым развитием репаративных процессов.

На 3-и сутки исследований в зоне сотрясения у животных 2-й опытной группы отмечали менее выраженные признаки расстройства системы микроциркуляторного русла, чем в контрольной и 1-й опытной группах, а также дистрофические и некротические процессы (рис. 4).

На 5-е сутки наблюдений у животных 2-й опытной группы отмечали активизацию процессов фибрилlogenеза (рис. 5).

Гистологические исследования показали, что ФДТ огнестрельных ран с комплексом «микрокапсулированный фотодитазин 0,1% – амфифильный полимер» стимулирует активизацию процессов очищения ран от колоний микроорганизмов, а также от некротизированных тканей и масс фибрина.

Таким образом, цитологические и гистологические исследования показали, что ФДТ с комплексом «микрокапсулированный фотодитазин – амфифильный полимер» экспериментальных огнестрельных ран мягких тканей приводит к быстрому купированию острых воспалительных явлений и расстройств системы

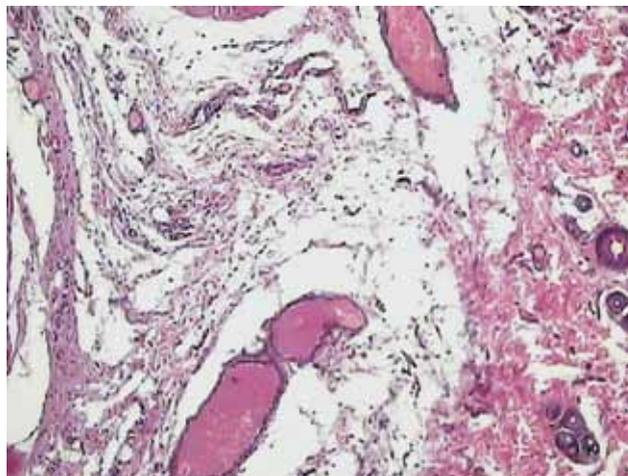


Рис. 4. Явления тромбоза в венах. Стаз и микротромбы в капиллярах. 2-я опытная группа. 3-и сутки наблюдений. Окр. гематоксилином и эозином. $\times 200$

Fig. 4. Thrombosis in veins. Stasis and microthrombi in capillaries. Experimental Group 2. Day 3. Staining: hematoxylin and eosin. $\times 200$

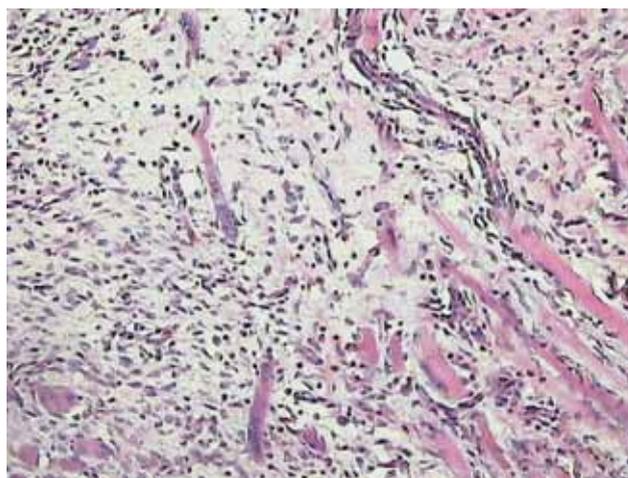


Рис. 5. Отек и лимфоидно-гистиоцитарные инфильтраты в зоне сотрясения. Участки некротизированных мышечных волокон. 2-я опытная группа. 5-е сутки наблюдений. Окр. гематоксилином и эозином. $\times 200$

Fig. 5. Edema and lymphoid-histiocyte infiltration in the area of concussion. Zones of necrotized muscle fibers. Experimental Group 2. Day 5. Staining: hematoxylin and eosin. $\times 200$

микроциркуляции, ограничению развития вторичных некрозов, восстановлению жизнеспособности поврежденных тканей в зоне сотрясения, раннему развитию процессов репарации, выраженной активации макрофагов, стимуляции ангио- и коллагенотенеза, ускорению рубцевания и эпителизации раневого дефекта.

Заклучение

Применение фотодинамической терапии с комплексом «микрокапсулированный фотодитазин 0,1% – амфифильный полимер» купирует расстройства системы микроциркуляции, активизирует альтеративно-экссудативную фазу воспаления. При этом в зоне сотрясения

происходит ограничение развития вторичных некрозов и восстановление жизнеспособности поврежденных тканей.

Литература

1. Байбури В.Б., Шульгина Т.А., Тучина Е.С. и др. Изучение антимикробной фотодинамической активности водных растворов наночастиц металлов // Вестник Саратовского государственного технического университета. – 2014. – Т. 4. – № 1 (77). – С. 81–87.
2. Дуванский В.А. Фотодинамическая терапия и NO-терапия в комплексном лечении больных с трофическими язвами венозного генеза // Лазерная медицина. – 2004. – Т. 8. – № 1–2. – С. 3–4.
3. Дуванский В.А., Дзагидзе Н.С., Бисеров О.В. и др. Микроциркуляция гнойных ран по данным лазерной доплеровской флоуметрии // Лазерная медицина. – 2007. – Т. 11. – № 1. – С. 46–49.
4. Елисеенко В.И., Дуванский В.А., Шин Е.Ф. Влияние фотодинамической терапии на процессы репарации гнойных ран // Лазерная медицина. – 2016. – Т. 20. – № 3. – С. 46.
5. 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.
6. Шмиголь Т.А., Собянин К.А., Прусак-Глотов М.В. и др. Применение антимикробной фотодинамической терапии на основе МЦ 540 К модели раневой инфекции // Вестник РГМУ. – 2018. – 1. – С. 30–35.
7. Nafee N., Youssef A., El-Gowelli H. et al. Antibiotic-free nanotherapeutics: Hypericin nanoparticles thereof for improved *in vitro* and *in vivo* antimicrobial photodynamic therapy and wound healing. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013; 454: 249–258.
8. Nesi-Reis V., Lera-Nonose DSSL., Oyama J. et al. Contribution of photodynamic therapy in wound healing: A systematic review. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2018 Mar; 21: 294–305.
9. Torchinov A.M., Umakhanova M.M., Duvansky R.A. et al. Photodynamic therapy of background and precancerous diseases of uterine cervix with photosensitisers of chlorine raw. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2008; 5 (S1): 45.

References

1. Baiburin V.B., Shulgina T.A., Tuchina E.S. et al. Studies of antimicrobial photodynamic activity of aqueous solutions of metal nanoparticles. *Vestnik Saratovskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta*. 2014; 4 (1 (77)): 81–87. [In Russ.].
2. Duvansky V.A. Photodynamic therapy and NO-therapy in the complex treatment of patients with trophic ulcers of venous origin. *Lasernaya medicina*. 2004; 8 (1–2): 3–4. [In Russ.].
3. Duvansky V.A., Dzagidze N.S., Biserov O.V. et al. Microcirculation of purulent wounds by laser Doppler flowmetry. *Lasernaya medicina*. 2007; 11 (1): 46–49. [In Russ.].
4. Yeliseenko V.I., Duvansky V.A., Shin E.F. Effects of photodynamic therapy at the reparation of purulent wounds. *Lasernaya medicina*. 2016; 20 (3): 46. [In Russ.].
5. Korabaev U.M., Teplyashin A.S., Stranadko E.Ph. et al. A method for the treatment of purulent diseases of soft tissues with photosensitizer “Photosens” and light sources – laser and non-laser. *Lasernaya medicina*. 1999; 3 (3–4): 80–82. [In Russ.].
6. Schmigol T.A., Sobyenin K.A., Prusak-Glotov M.V. et al. Antimicrobial photodynamic therapy applied for MC 540 K model of wound infection. *Vestnik RGMU*. 2018; 1: 30–35. [In Russ.].
7. Nafee N., Youssef A., El-Gowelli H. et al. Antibiotic-free nanotherapeutics: Hypericin nanoparticles thereof for improved *in vitro* and *in vivo* antimicrobial photodynamic therapy and wound healing. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013; 454: 249–258.
8. Nesi-Reis V., Lera-Nonose DSSL., Oyama J. et al. Contribution of photodynamic therapy in wound healing: A systematic review. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2018 Mar; 21: 294–305.
9. Torchinov A.M., Umakhanova M.M., Duvansky R.A. et al. Photodynamic therapy of background and precancerous diseases of uterine cervix with photosensitisers of chlorine raw. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2008; 5 (S1): 45.