

# МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ С 1% ВОДНЫМ РАСТВОРОМ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ЭРОЗИВНО-ЯЗВЕННЫХ ПОРАЖЕНИЙ ПОЛОСТИ РТА

Кармалькова И. С., Юдина О. А., Мостовников А. В.  
Белорусский государственный медицинский университет, Минск

Karmalkova I. S., Yudina O. A., Mostovnikov A. V.  
Belarusian State Medical University, Minsk

Experimental justification of possibility for administration of photodynamic therapy with «Fotolon» for the management of ulcerative and erosive lesions of oral mucosae membrane

**Резюме.** В ходе экспериментального исследования установлено, что фотодинамическая терапия с 1% водным раствором метиленового синего может быть эффективна в лечении эрозивно-язвенной патологии слизистой оболочки рта, так как способствует формированию ограниченного дефекта, уменьшает воспалительную инфильтрацию, способствует быстрой элиминации детрита из дефекта и формированию «нежного» рубца.

**Ключевые слова:** фотодинамическая терапия, эрозивно-язвенные поражения полости рта, фотосенсибилизаторы, методы лечения эрозивно-язвенной патологии полости рта, метиленовый синий.

Современная стоматология. – 2015. – №2. – С. 57–60.

**Summary.** In this study methylene blue-mediated photodynamic therapy was used as a possible alternative method for the treatment of ulcerative and erosive lesions of oral mucosae membrane. Methylene blue-mediated photodynamic therapy has the potential to improve the management of ulcerative and erosive lesions of oral mucosae membrane.

**Keywords:** photodynamic therapy, ulcerative and erosive lesions in dentistry, treatment of ulcerative and erosive lesions of oral mucosae membrane, methylene blue.

Sovremennaya stomatologiya. – 2015. – N2. – P. 57–60.

В течение последних десятилетий ученые разных стран активно ведут поиск новых высокоэффективных методов лечения эрозивно-язвенной патологии слизистой оболочки рта. Определенные перспективы в решении этой проблемы открываются с применением фотодинамической терапии.

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – метод лечения, который заключается в применении специального химического вещества (фотосенсибилизатора), накапливающегося в патологическом очаге и инициируемого источником света с длиной волны, соответствующей максимальному пику его поглощения [2, 5, 10, 15].

Впервые элементы фотосенсибилизации для лечения кожных заболеваний стали использовать в Древнем Египте, Китае, Индии и Греции, где экстракты псораленсодержащих растений и солнечный свет применяли для лечения витилиго, псориаза и других кожных болезней [1, 2, 9].

Фотодинамический эффект был открыт в 1900 году О. Раабом, аспирантом из-

вестного биолога Г. фон Таппейнера [1, 2, 14, 15]. При изучении влияния флюоресцентных красителей акридина и его производных на инфузории и другие простейшие он обнаружил, что при освещении окрашенные одноклеточные останавливаются и погибают [1]. После защиты диссертации О. Рааб ушел из науки, но Г. фон Таппейнер продолжил исследования. Он сформулировал термин «фотодинамический эффект», предполагающий воздействие света на динамику клеток; иногда этот эффект называют фотосенсибилизацией, приданием фоточувствительности клеткам или организмам [9, 11, 14, 15].

В 1902 году было показано, что кроме красителя и света для фотодинамического воздействия на клетки нужен третий обязательный компонент – кислород. В том же году Г. Дрейер открыл бактерицидный эффект при действии света на окрашенные бактерии.

Первое клиническое применение фотодинамической терапии было описано Н. Тарпейнер и А. Жесонек в 1903 году [9, 11, 14, 15]. С тех пор фотодинамическая

терапия активно развивается, находя применение в различных областях медицины.

Фотодинамическая терапия – трехкомпонентный метод лечения. Два компонента (фотосенсибилизатор и свет) являются экзогенными внешними факторами. Третьим обязательным компонентом фотодинамической реакции является эндогенный фактор – кислород [1–5, 11, 13–15].

Условно механизм фотодинамической терапии можно разделить на две части: фотодинамическую реакцию, развивающуюся во время лазерного воздействия, и фотодинамический процесс, происходящий в дальнейшем [11].

Фотохимические реакции (процессы фотосенсибилизации), при которых используется кислород, разделяют на 2 типа в зависимости от первичного вовлечения радикальных посредников [2, 4, 9, 11, 14].

Фотохимические реакции первого типа включают прямое воздействие возбужденного светом фотосенсибилизатора на субстрат и образование переходных радикалов, которые затем вступают в

реакцию с кислородом. Поглощая квант света, молекула фотосенсибилизатора переходит из основного в возбужденное состояние. В дальнейшем возбужденная молекула может претерпевать обратный переход в основное состояние с излучением кванта света (флуоресценцией), или, находясь в триплетном состоянии, фотосенсибилизатор вступает во взаимодействие с биологическими молекулами, отнимая у них электроны или атомы водорода, инициирует образование свободных радикалов, вызывающих окисление.

В фотодинамической реакции второго типа перенос энергии осуществляется из возбужденного триплетного состояния фотосенсибилизатора на молекулярный кислород с образованием синглетной формы кислорода, который быстро и активно реагирует с многочисленными биомолекулами, входящими в состав клеточных мембран [9–11, 14, 15]. Под влиянием светового воздействия, избирательно поглощаемого фотосенсибилизатором, начинается каскад фотохимических реакций, сопровождаемый образованием ряда активных форм кислорода, свободных радикалов, которые и оказывают действие на патологические клетки и ткани. Основное значение в процессе фотодинамической терапии отводят синглетному состоянию кислорода [2, 4, 11–13].

Большинство фотосенсибилизаторов способны индуцировать процессы как первого, так и второго типа, хотя обычно преобладает какой-то один тип. К фотосенсибилизаторам, инициирующим преимущественно процесс второго типа, относятся порфирины, метиленовый синий, флуоресцеин, толуидиновый синий [4, 7].

Избирательность воздействия при фотодинамической терапии определяется способностью фотосенсибилизатора накапливаться преимущественно в клетках-мишенях, а ключевым моментом для оптимального ответа на воздействие является достаточное его накопление [2, 9, 11]. В начальной стадии фотосенсибилизатор захватывается большинством нормальных клеток и клеток-мишеней, но дольше удерживается последними.

Для эффективной фотосенсибилизации очень важны физико-химические свойства фотосенсибилизаторов. Химическая чистота, способность избирательно и быстро накапливаться в клетках-мишенях, короткий интервал между введением и его максимальным накоплением, быстрая элиминация из

нормальных тканей, активация при длине волны, оптимальной для проникновения в ткань, высокие квантовые поля для образования синглетного кислорода, существенное повышение чувствительности биологических тканей к свету, сильное поглощение в спектральном диапазоне, где биологические ткани имеют наибольшее пропускание и отсутствие «темновой» токсичности – желаемые характеристики идеального фотосенсибилизатора [2, 9–14].

Фотосенсибилизирующие вещества могут быть разделены на три больших семейства:

- на основе порфирина (фотофрин и др.);
- на основе хлорофилла (хлорины, пурпурины, бактериохлорины и др.);
- красители (фталоцианин, нафтаоцианин и др.) [9].

Некоторые красители обладают антибактериальной активностью без дополнительного светового воздействия, например, акрифлавин или метиленовый синий. Известно, что синие красители являются сильными сенсбилизаторами для ряда бактерий при взаимодействии с лазером в видимом красном спектре [6].

Метиленовый синий был первым красителем, который использовался в медицине в качестве антисептического средства, а также первым протестированным и разрешенным к применению фотосенсибилизатором для антимикробной фотодинамической терапии [3, 15].

Согласно литературным данным, для активации фотосенсибилизаторов сегодня с успехом применяют как лазерные аппараты, так и другие источники света в диапазоне спектра поглощения используемого фотосенсибилизатора [2, 15]. Однако для эффективной фотодинамической терапии предпочтительно применять именно лазерные источники света (когерентность, монохроматичность, интенсивность и сингулярность направления лазерного излучения). Также лазеры позволяют достичь высокой плотности мощности в требуемом спектральном диапазоне, имеется возможность доставки излучения к очагу без значительных потерь мощности и возможность точного измерения дозы облучения [4, 14].

В настоящее время в арсенале стоматолога достаточно широкий спектр средств медикаментозной терапии эрозивно-язвенных поражений слизистой оболочки рта, однако их применение не всегда эффективно.

Лекарственные способы лечения заболеваний слизистой оболочки рта сопряжены с определенными трудностями, связанными с недостаточным спектром лечебного действия различных медикаментов – противовоспалительным, антимикробным, противоотечным и др. В клинической практике нередко приходится применять несколько препаратов одновременно, что не всегда эффективно, так как помимо их синергического действия может возникать и противоположный эффект. Кроме того, возможны аллергические реакции, что на фоне иммунодефицита, имеющего место при эрозивно-язвенной патологии слизистой оболочки рта, чревато рядом осложнений, резко понижающих эффективность лечения [8]. Стоит отметить, что у большинства пациентов с эрозивно-язвенными поражениями полости рта имеется обширная картина общесоматической патологии. Поэтому применение многочисленных по спектру патогенетического воздействия методов и средств во многом ограничено возможными побочными эффектами и противопоказаниями. В связи с этим поиск новых максимально эффективных способов воздействия на эрозивно-язвенные поражения слизистой оболочки рта является актуальным [8].

Фотодинамическая терапия, обладая весьма широким диапазоном действия [2–8, 10, 13–15], является перспективным направлением для изучения возможности и эффективности ее применения в лечении пациентов с эрозивно-язвенными поражениями слизистой оболочки рта.

**Цель исследования** – изучить влияние фотодинамической терапии с фотосенсибилизатором 1% водным раствором метиленового синего на характер репаративных процессов в слизистой оболочке рта лабораторных животных.

#### **Материалы и методы**

Для изучения влияния фотодинамической терапии с фотосенсибилизатором 1% водным раствором метиленового синего на характер репаративных процессов в слизистой оболочке рта нами были выбраны собаки.

Проведение экспериментальных исследований на собаках обусловлено:

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

Эксперимент проходил в виварии Белорусского государственного медицинского университета в соответствии с правилами работы с лабораторными животными, с учетом принципов Всемирного общества защиты животных 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 оболочки рта (по 5 язв на слизистой оболочке щеки у 8 собак, разделенных на 2 группы). На 2–5-е сутки проводили фотодинамическую терапию с фотосенсибилизатором 1% водным раствором метиленового синего (1-я группа) и традиционное медикаментозное лечение (2-я группа).

В качестве источника лазерного излучения был применен фототерапевтический аппарат «Снаг-Сэнс-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 флуоресцентной диагностики.

В 1-й группе фотосенсибилизатор 1% водный раствор метиленового синего на стерильной марлевой повязке помещали в полость рта лабораторных животных на область ранее смоделированных язвенных поражений на 10 минут. Избытки фотосенсибилизатора удаляли стерильной салфеткой и проводили сеанс фотодинамической терапии.

Во 2-й группе лабораторных животных проводили традиционное лечение язвенных поражений слизистой оболочки рта с орошением полости рта 0,05% водным раствором хлоргексидина биглюконата и аппликацией мазей «Репарэф-1» и «Репарэф-2» в зависимости от стадии патологического процесса.

Моделирование язв на слизистой оболочке щеки у собак и забор морфологического

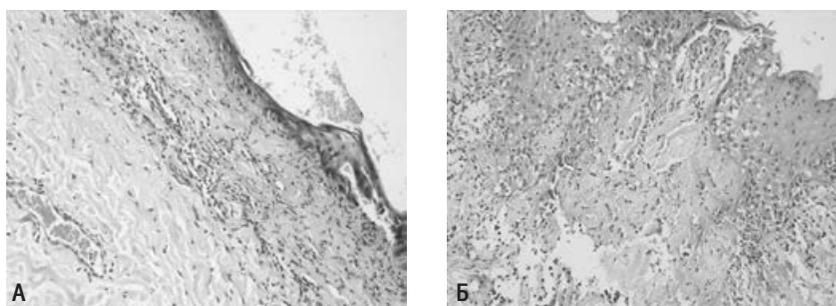


Рис. 1. Микроскопическая картина изменений многослойного плоского эпителия в субэпителиальной зоне: А – в группе с фотодинамической терапией, Б – в группе с традиционным методом лечения (окраска гематоксилином и эозином, ув. х50)

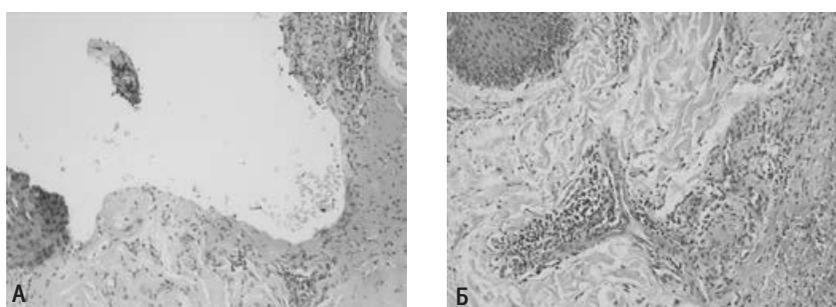


Рис. 2. Микроскопическая картина формирования язвенного дефекта: А – в группе с фотодинамической терапией, Б – в группе с традиционным методом лечения (окраска гематоксилином и эозином, ув. х200)

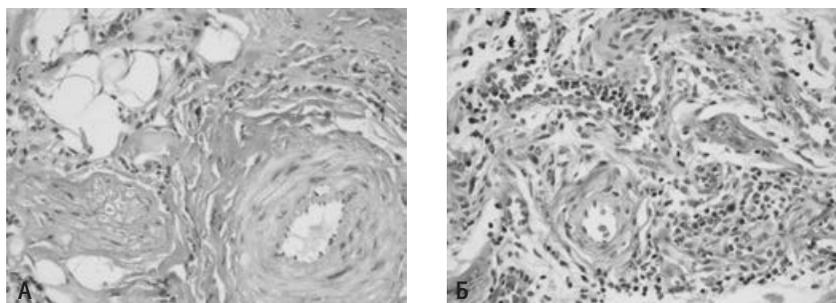


Рис. 3. Микроскопическая картина вовлечения нервных стволиков в патологический процесс: А – в группе с фотодинамической терапией, Б – в группе с традиционным лечением (окраска Martius–Scarlett–Blue, ув. х400)

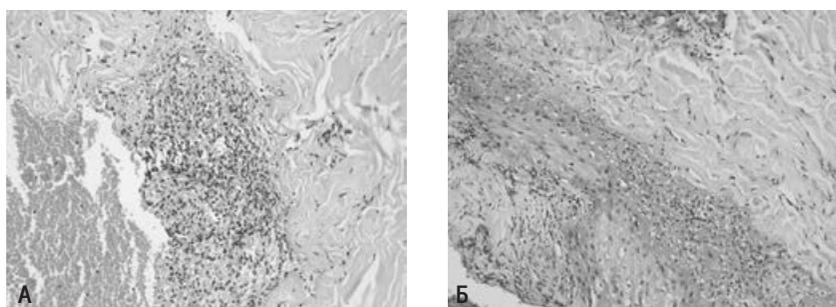


Рис. 4. Микроскопическая картина очищения язвенного дефекта от детрита: А – в группе с фотодинамической терапией, Б – в группе с традиционным лечением (окраска гематоксилином и эозином, ув. х200)

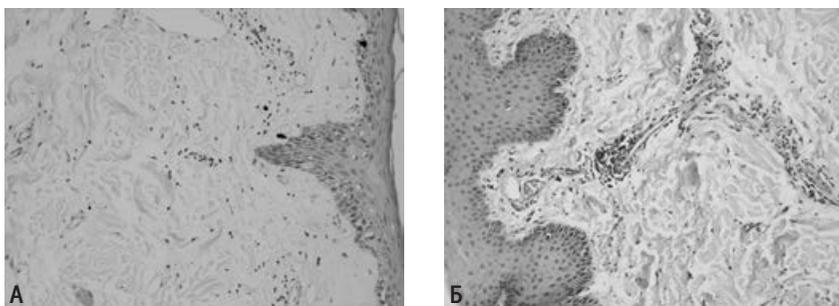


Рис. 5. Микроскопическая картина «заживления» язвенного дефекта: А – в группе с фотодинамической терапией, Б – в группе с традиционным лечением (окраска гематоксилином и эозином, ув. x200)

материала проводили под внутривенным тиопенталовым наркозом. Морфологический материал забирали ежедневно, после проведения лечебных процедур.

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 волокон.

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

#### Результаты и обсуждение

##### I. Оценка изменений многослойного плоского эпителия в субэпителиальной зоне

В группе лабораторных животных с фотодинамической терапией (рис. 1А) изменения многослойного плоского эпителия характеризуются протяженностью и вовлечением коллагеновых волокон (поверхностный некроз) и сосудов в субэпителиальной зоне.

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

##### II. Формирование язвенного дефекта

При проведении фотодинамической терапии формируется глубокий, но узкий дефект (рис. 2А). Формирование язвенного дефекта в группе с

традиционным лечением запаздывает (рис. 2Б), однако дефект формируется широкий, за счет мультифокальности повреждения.

##### III. Вовлечение нервных стволиков

В 1-й группе не наблюдалось вовлечения нервных стволиков в патологический процесс (рис. 3А). При применении раствора хлоргексидина и мазей «Рэпареф-1» и «Рэпареф-2» (2-я группа) инфильтрат плотный, преимущественно периваскулярный и периневральный (рис. 3Б), что в клинической практике обуславливает наличие болевого синдрома.

##### IV. Очистка дефекта от детрита

Очистка дефекта от детрита происходит неравномерно в сравниваемых группах. Если в группе с фотодинамической терапией дефект к третьим суткам очищается от детрита (рис. 4А), то в группе с традиционным лечением на третьи сутки еще остаются очаги эпителиального покрова (рис. 4Б).

##### V. «Заживление» дефекта

«Заживление» дефекта наблюдается примерно в одинаковые сроки в обеих группах (рис. 5А, Б), при этом в зажившем дефекте в группе с традиционным лечением сохраняется скудный воспалительный инфильтрат в субэпителиальной зоне и единичные огрубевшие коллагеновые волокна, чего нет при проведении фотодинамической терапии.

##### Заключение

Применение фотодинамической терапии с 1% водным раствором метиленового синего способствует формированию ограниченного дефекта, уменьшает распространение дефекта и воспалительную инфильтрацию, способствует отсутствию боли, быстрой элиминации детрита из дефекта и формированию «нежного» рубца, что

позволяет предположить, что данный метод может быть эффективен в клинической практике, так как будет способствовать более быстрому заживлению эрозивно-язвенного поражения.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Беляева, Л. А. Основы флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии (обзор литературы) / Л.А. Беляева, А.А. Степанян, Л.В. Адамян // Проблемы репродукции. – 2004. – № 1. – С. 6–12.
2. Голдман, М. П. Фотодинамическая терапия / М.П. Голдман // М., 2011. – 120 с.
3. Заблодский А. Н. Фотодинамическая терапия метиленовым синим геликобактериоза у детей / А.Н. Заблодский, Ю.В. Плавский, А.И. Третьякова, И.А. Заблодский // Иммунопатология. – 2001. – № 3. – С. 74–77.
4. Зольникова, Н. Е. Интралакунарная фотодинамическая терапия хронического тонзиллита / Н.Е. Зольникова // Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Оренбург, 2004. – 122 с.
5. Казеко, Л. А. Возможность применения фотодинамической терапии для лечения эрозивно-язвенных поражений слизистой оболочки ротовой полости / Л.А. Казеко, И.С. Кармалькова // Медицинские новости. – 2012. – № 5. – С. 21–23.
6. Курочкина, А. Ю. Использование фототерапии в лечении болезней пародонта: современные аспекты и перспективы применения в Республике Беларусь (обзор литературы) / А.Ю. Курочкина // Медицина. – 2008. – № 3. – С. 36–39.
7. Орехова, Л. Ю. Фотодинамическая терапия в клинике терапевтической стоматологии / Л.Ю. Орехова, А.А. Лукавенко, О.А. Пушкарев // Клиническая стоматология. – 2009. – № 1. – С. 26–30.
8. Прохончуков, А. А. Лечение заболеваний пародонта и слизистой оболочки рта с применением лазерного и магнитно-лазерного излучения / А.А. Прохончуков, Н.А. Жижина, Л.А. Григорьянц, М.Л. Стебелькова, А.М. Рассадин, Ю.С. Алябьев, В.А. Бадалян, В.В. Богатов, В.И. Вахтин, Г.М. Корж, А.Б. Виноградов, А.Г. Ватлин // Периодонтология. – 2008. – № 4 (49). – С. 36–42.
9. Романко, Ю. С. Основы фотодинамической терапии / Ю.С. Романко, С.В. Коренев, В.В. Попучиев, И.З. Вайсбейн, Т.Е. Сухова // Калининград, 2010. – 136 с.
10. Салмин, Р. М. Основные направления фотодинамической терапии в медицине / Р.М. Салмин, А.А. Стенько, И.Г. Жук, М.Ю. Брагов // Новости хирургии. – 2008. – № 3. – С. 155–162.
11. Узденский, А. Б. Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии / А.Б. Узденский // Санкт-Петербург. – Наука. – 2010. – 327 с.
12. Улащик, В. С. Фотодинамическая терапия и ее применение в клинической медицине / В.С. Улащик // Здоровоохранение. – 2006. – № 6. – С. 24–28.
13. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform / T. Dai, B.B. Fuchs, J.J. Coleman, R.A. Prates, C. Astrakas, T.G. St. Denis, M.S. Ribiero, E. Mylonakis, M.R. Hamblin, G.P. Tegos // Frontiers in microbiology. – 2012. – Vol. 3. – P. 1–16.
14. Doshi, Y. Photodynamic therapy: a new vista in management of periodontal disease / Y. Doshi, Priya S. Patil, N. Shah, S. Dixit, M. Shah // Journal of the International Clinical Dental Research Organization. – 2010. – Vol. 2. – Issue 2. – P. 57–63.
15. Rajesh, S. Antimicrobial photodynamic therapy: an overview / S. Rajesh, E. Koshi, M. Apama // J. Indian Soc. Periodontol. – 2011. – № 15 (4). – P. 323–327.

Поступила 08.07.2015