

УДК 616.211-08
©Коллектив авторов

ПОДБОР ЭФФЕКТИВНЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЛОР-ОРГАНОВ НА ОСНОВЕ ИЗУЧЕНИЯ ИХ НАКОПЛЕНИЯ В ПАТОЛОГИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННЫХ ТКАНЯХ

Ю.В. Алексеев^{1}, Е.В. Лихачева¹, Д.В. Терёшкин¹, Г.В. Пономарев², Е.М. Мазур¹*

¹ФГУ "ГНЦ лазерной медицины ФМБА России", 1211656, Москва,
Студенческая ул., д. 40, стр. 1; тел./факс: (499)249-36-52;
эл. почта ziganova@yandex.ru

²Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский
институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича РАМН, 119121, Москва,
ул. Погодинская, 10

Исследовали оценку накопления фотосенсибилизаторов – производных хлоринов Е6 (“Радахлорин”, “Фотодитазин”, “бальзам Залевского”) в слизистой оболочке у пациентов с риносинуситами и хроническими тонзиллитами, подбор наиболее эффективных источников излучения и оценку клинических результатов у 30 больных с риносинуситами и 10 больных с тонзиллитами. В качестве источников излучения использованы светодиодный матричный прибор “АСТ” (длина волны излучения около 405 нм (полоса Core)) и лазерный аппарат ЛАХТА-“МИЛОН”-ML500-SP (длина волны 662 нм). Накопление препаратов в слизистой и изменение их концентрации в результате облучения оценивали по изменению флуоресценции, измеряемой с помощью спектрофотометра ЛЭСА-01-БИОСПЕК. Процент снижения флуоресценции составил от 50% до 92,7%, что свидетельствует об интенсивном распаде фотосенсибилизаторов с высоким выбросом синглетного кислорода, следовательно, высокой терапевтической активности метода. Эффективность метода подтверждают и клинические результаты.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, хлорины Е6, спектроскопия, риносинусит, тонзиллит.

ВВЕДЕНИЕ. Фотодинамическая терапия (ФДТ), основанная на свойстве фотосенсибилизаторов накапливаться в поражённых тканях и под воздействием светового излучения в спектре их поглощения генерировать синглетный кислород, обоснованно входит в клиническую практику при лечении целого ряда заболеваний. По нашему мнению, она может стать общепринятым и доступным методом для большинства лечебных учреждений. Ранее этот метод применялся, в основном, в онкологии с источниками излучения в красном диапазоне спектра [1-3].

* - адресат для переписки

ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРЫ В ЛЕЧЕНИИ ЛОР-БОЛЕЗНЕЙ

При ФДТ большинства неонкологических оториноларингологических (ЛОР) заболеваний большая глубина (свыше 2-3 мм) проникновения возбуждающего света не требуется, поэтому эффективно применение источников излучения с максимумами в длинноволновом УФ- и синем (фиолетовом) диапазонах. Известно, что фотосенсибилизаторы - производные хлорина Е6 имеют полосы поглощения в УФ и видимом диапазонах (наиболее интенсивные в синем и красном) [4-6]. В нашей работе основное внимание уделено наружному применению фотосенсибилизаторов хлоринового ряда: "Радахлорин", "Фотодитазин" и "Бальзам Залевского", основным компонентом которых (70-96%) служит хлорин Е6 (рис. 1). Установлено, что эти хлорины хорошо накапливаются в тканях кожи и слизистых при воспалительных процессах, обладают иммуномодулирующими свойствами, а также антибактериальной, противогрибковой и антивирусной активностью при проведении ФДТ [7, 8].

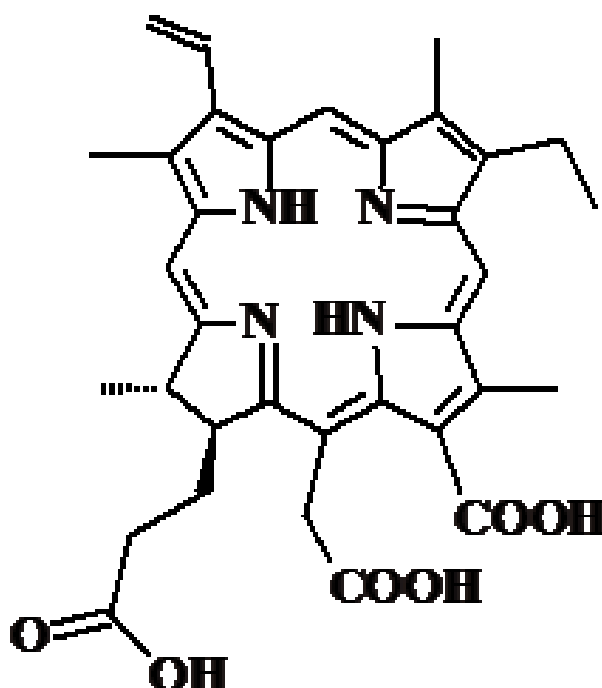


Рисунок 1.
Хлорин Е6.

ФДТ – это процесс, основанный на световой активации находящегося в ткани фотосенсибилизатора и его последующем обратном переходе в неактивное состояние, сопровождающийся передачей энергии растворенному в тканях кислороду, что ведёт к переходу последнего в биологически-активную форму – синглетный кислород. Синглетный кислород является высокоактивным биологическим агентом, появление которого в ткани ведет к подавлению жизнедеятельности бактерий, разрушению микроорганизмов. В результате действия синглетного кислорода и образующихся при его участии продуктов (гидроксильных радикалов и пероксидов) происходит гибель и повреждение (фотохемомодификация) микроорганизмов. Необычайно короткое время жизни синглетного кислорода, образующегося в результате запуска фотохимической реакции, обуславливают высокую селективность лечебного действия.

ФДТ с наружным применением таких фотосенсибилизаторов в виде соответствующих гелей является новым и высокоэффективным способом лечения ЛОР-болезней и позволяет добиться хороших клинических результатов в краткие сроки лечения, а также имеет целый ряд преимуществ перед применяемыми в настоящее время методиками. Представленная статья посвящена изучению оценки накопления фотосенсибилизаторов – производных природного хлорофилла (“Радахлорин”, “Фотодитазин” и “Бальзам Залевского”) в слизистой оболочке у пациентов с ЛОР – патологией, разработке целенаправленного подбора наиболее эффективных источников излучения в спектре действия данных препаратов и оценке терапевтической эффективности применения ФДТ в комплексном лечении больных с хроническими тонзиллитами и риносинуситами.

Хронический тонзиллит – инфекционно–аллергическое заболевание с преимущественной локализацией воспалительного процесса в небных миндалинах. Этиологическим фактором является патогенная микрофлора лакун небных миндалин, преимущественно смешанная, с преобладающей ролью β -гемолитического стрептококка и золотистого стафилококка или их ассоциаций, а также вирусной и грибковой этиологии, так же имеет место алергизирующие этиологический фактор.

Хронический риносинусит – хроническое воспалительно-аллергическое поражение околоносовых пазух, вызванные различной микрофлорой: от высокопатогенной до условно-патогенной и сапрофитной (преобладающая микрофлора: стафилококки, разные виды стрептококков, пневмококки, диплококки, энтерококки, протей, синегнойная и кишечная палочки, грибы), а также разнообразные аллергены (бытовые, растительные, животные и т.д.).

Работа проведена в соответствии с медицинской технологией “Фотодинамическая терапия при лечении хронических ринитов и риносинуситов” (№ ФС – 2006/065, регистрационное удостоверение от 5 мая 2006 года, заявитель – ЗАО “БЕТА-ГРАНД”, 123056, г. Москва, ул. Малая Грузинская, д. 38, стр. 1, авторы: Е.В. Лихачева, С.А. Агеева).

МЕТОДИКА. В исследование были включены 40 больных с различной ЛОР-патологией старше 18 лет со средним возрастом около 39 лет (информированное согласие больных получено). Среди пациентов мужчин было 26 (65%), женщин 14 (35%).

Пациенты с заболеваниями ЛОР-органов были распределены по двум нозологическим группам. С хроническими тонзиллитами было 10 (25%) пациентов, с риносинуситами - 30 (75%) пациентов.

В работе использовано 3 препарата:

- “Фотодитазин”, Регистрационное удостоверение № ФС 012a2006\4192-06 от 27 декабря 2006 г., представляет собой фотосенсибилизатор второго поколения на основе хлорина Е6 (бис-N-метил-глюкаминавая соль хлорина Е6) (ООО “Бета-Гранд”).

“Фотодитазин” - кристаллический порошок темно-зеленого цвета, без запаха. Лекарственная форма – прозрачная жидкость интенсивного темно-зеленого цвета – 0,5% раствор препарата в физиологическом растворе или гель. Препарат обладает выраженной полосой поглощения в области видимого спектра (максимум 662 нм в биологических средах) [6].

- “Радахлорин”, Регистрационный номер № ЛС – 001868 2006-08-04. Представляет собой комплекс из 3 циклических тетрапирролов хлоринового ряда, содержащих в качестве основного компонента хлорин Е6 (70-90%), используется в виде 0,35% раствора для внутривенного введения и 0,1% и 1,0% геля для наружного применения. Радахлорин способен разрушать биологические субстраты после возбуждения светом с длиной волны 654–670 нм. Высокая степень фототоксичности радахлорина связана с высоким квантовым выходом синглетного кислорода – одного из основных токсических агентов, образующихся под действием света при ФДТ. Сохраняющаяся при этом способность препарата флуоресцировать является основанием возможности для люминисцентной диагностики. [8]

ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРЫ В ЛЕЧЕНИИ ЛОР-БОЛЕЗНЕЙ

- “Бальзам Залевского”, (санитарно-эпидемиологическое заключение № 77.01.12.915.П.051037.08.06 от 25.08.2006 ПР 73.В270037 ГОСТ Р 51579-2005д) – препарат, в котором создано устойчивое равновесие между оксидантами (хлорофилл) и антиоксидантами (каротиноиды). В состав лосьона-спрея “Бальзам Залевского” входят два активных компонента природного происхождения – хлорофилл-липидный комплекс (масло микроводоросли спироулины *Spirulina platensis*) и масло сибирского кедра. Ценность такого состава заключается в том, что он, в сочетании с витамином F, обеспечивает оптимальный кислотно-основной баланс.

В качестве источников света применяли 3 устройства:

- *Светодиодный матричный прибор “АСТ”*, регистрационное удостоверение №ФСР 2008\02720, с длиной волны излучения с пиком 405 нм, соответствующим полосе Соре хлорина Е6. Максимальная мощность в фокусном пятне на выходе излучателя 0,5 Вт [9].

- *Аппарат лазерный хирургический фотодинамического и гипертермического режимов воздействия, программируемый ЛАХТА–“МИЛОН”-ML500-SP*, разработанный фирмой ЗАО “МИЛОН ЛАЗЕР” - г. Санкт-Петербург, с длиной волны 662 нм, работающий в импульсно-периодическом режиме, с выходной мощностью от 0,1 до 2,5 Вт.

- *Установка лазерная электронно-спектральная ЛЭСА-01-БИОСПЕК*, разработанная Лабораторией лазерной биоспектроскопии Центра естественно-научных исследований Института общей физики Российской академии наук (ЦЕНИ ИОФ РАН), дает возможности сравнения степени накопления препарата в поражённом органе с эталоном или здоровой тканью.

Воздействию лазерного облучения подвергали точки в районе видимого поражения, а также нормальная (визуально) слизистая оболочка на разном удалении от пораженных участков. Регистрировали спектр флуоресценции из каждой исследуемой точки.

Оценивали соотношение интенсивности флуоресценции к так называемой лазерной линии (интенсивность излучения, диффузно отраженного от тканей).

У пациентов с риносинуситами гель фотосенсибилизатора наносили на ватный тампон линейно вдоль боковой поверхности тампона, затем тампон вводили в общий носовой ход на глубину 5-7 см, так, чтобы полоска геля соприкасалась с поверхностью нижней носовой раковины. Через 60 мин проводили сканирующее воздействие лазерным лучом эндоназально с мощностью излучения на выходе световода 0,8-1,5 Вт, доза излучения от 30 до 60 Дж/см². Время экспозиции составляло 2-3 мин для каждой половины носа. Излучатель устанавливали дистанционно на расстоянии 0,5-1 см от переднего конца нижних носовых раковин. Необходимости в проведении анестезии не было.

Производили от 2-х до 5 сеансов фотодинамической терапии с интервалами между процедурами 10-14 дней [10, 11].

У пациентов с хроническими тонзиллитами проводили 2-3 сеанса ФДТ с интервалом 3-5 дней (по необходимости) по следующей методике: поверхность нёбных миндалин тщательно смазывали гелем фотосенсибилизатора, как можно более тщательно обрабатывая лакуны. Через 60 минут производили дистанционное облучение расфокусированным лучом мощностью 0,8-1,2 Вт на выходе световода доза излучения от 30 до 60 Дж\см², сканируя по поверхности нёбной миндалины по 2-3 минуты с каждой стороны. Наконечник излучателя располагали за зубами, не далее середины языка [11].

После сеансов состояние пациентов было удовлетворительным, реактивные явления почти отсутствовали, у некоторых пациентов, страдающих ринитами, отмечалось преходящее усиление отека слизистой оболочки носовых раковин, увеличение выделения слизистого отделяемого, но в большинстве случаев наблюдалось улучшение носового дыхания сразу после процедуры.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Измерение флуоресценции производили у пациентов до и после проведения процедуры ФДТ (табл. 1, 2).

Таблица 1. Динамика изменения флуоресценции препаратов хлоринового ряда у 30 пациентов с риносинуситами в процессе ФДТ.

Препарат	Светодиодный матричный прибор «АСТ»			ЛАХТА– «МИЛЮН» - ML500-SP	
	До облучения (ед.ф.)	После облучения (ед.ф.)	% снижения флуоресценции	После облучения (ед.ф.)	% снижения флуоресценции
Радахлорин	3050±210	225±25*	92,7%	1450±96*	53%
Фотодитазин	2870±245	460±80*	83%	1270±104*	56,3%
Бальзам Залевского	2250±160	850±70*	63%	815±47	65%

Примечание. Здесь и в таблице 2 * - $p < 0,05$.

Таблица 2. Динамика изменения флуоресценции препаратов хлоринового ряда у 10 пациентов с тонзиллитами в процессе ФДТ.

Препарат	Светодиодный матричный прибор «АСТ»			ЛАХТА– «МИЛЮН» - ML500-SP	
	До облучения (ед.ф.)	После облучения (ед.ф.)	% снижения флуоресценции	После облучения (ед.ф.)	% снижения флуоресценции
Радахлорин	2100±145	300±35*	85,8%	1006±62*	56,5%
Фотодитазин	2200±135	610±50*	72,3%	1100±46*	50%

О накоплении препаратов–фотосенсибилизаторов судили по их флуоресценции. Такой подход широко применяется в подобных исследованиях. Степень накопления препаратов индивидуальна для каждого отдельного пациента. В таблицах представлены усреднённые значения, что указывает на необходимость обязательного использования спектроанализаторов для контроля в процессе проведения фотодинамической терапии.

На основании проведенного по нашей методике исследования накопления фотосенсибилизаторов в эпителиальных тканях организма, можно заключить, что исследуемые препараты хлоринового ряда (“Бальзам Залевского”, “Фотодитазин” и “Радахлорин”) способны хорошо накапливаться в слизистой оболочке носа и глотки при различных воспалительных и пролиферативных заболеваниях. После облучения источником света с максимумами длин волн 405 и 662 нм также проводили спектрофотометрию участка облучения, которая показывала значительное снижение интенсивности флуоресценции препаратов хлоринового ряда в слизистой оболочке носа и глотки, что указывает на снижение

концентрации препаратов в тканях. Такие результаты говорят о наличии фотодинамического эффекта, оказываемого сочетанием фотосенсибилизаторов хлоринового ряда и источниками света с данными спектров их поглощения.

Исследования накопления фотосенсибилизаторов хлоринового ряда на установке ЛЭСА-01-BIOSPEC у пациентов с заболеваниями ЛОР-органов. Результаты этих исследований показаны на рисунках 2-4. Они оценивались по общеклиническим показателям (улучшение или восстановление носового дыхания, прекращение гнойного отделяемого из полости носа и околоносовых пазух, уменьшение или отмена использования топических адреномиметиков и других препаратов (при риносинуситах), при хронических тонзиллитах – уменьшение или исчезновение боли в горле, уменьшение или прекращение выделения гнойных пробок из лакун миндалин, улучшение общего состояния. Также учитывались лабораторные показатели (общий анализ крови, ревмопробы, иммунологические показатели). Клинически выздоровление зафиксировано у 19 человек (47,5%), значительное улучшение состояния наблюдалось у 15 человек (37,5%), незначительное улучшение у 4 (10%), без изменений 2 человека (5%). Ухудшения состояния не отмечалось. Все пациенты хорошо переносили процедуры фотодинамического воздействия, болезненных ощущений не наблюдалось. Не зафиксировано случаев аллергических и других побочных реакций.

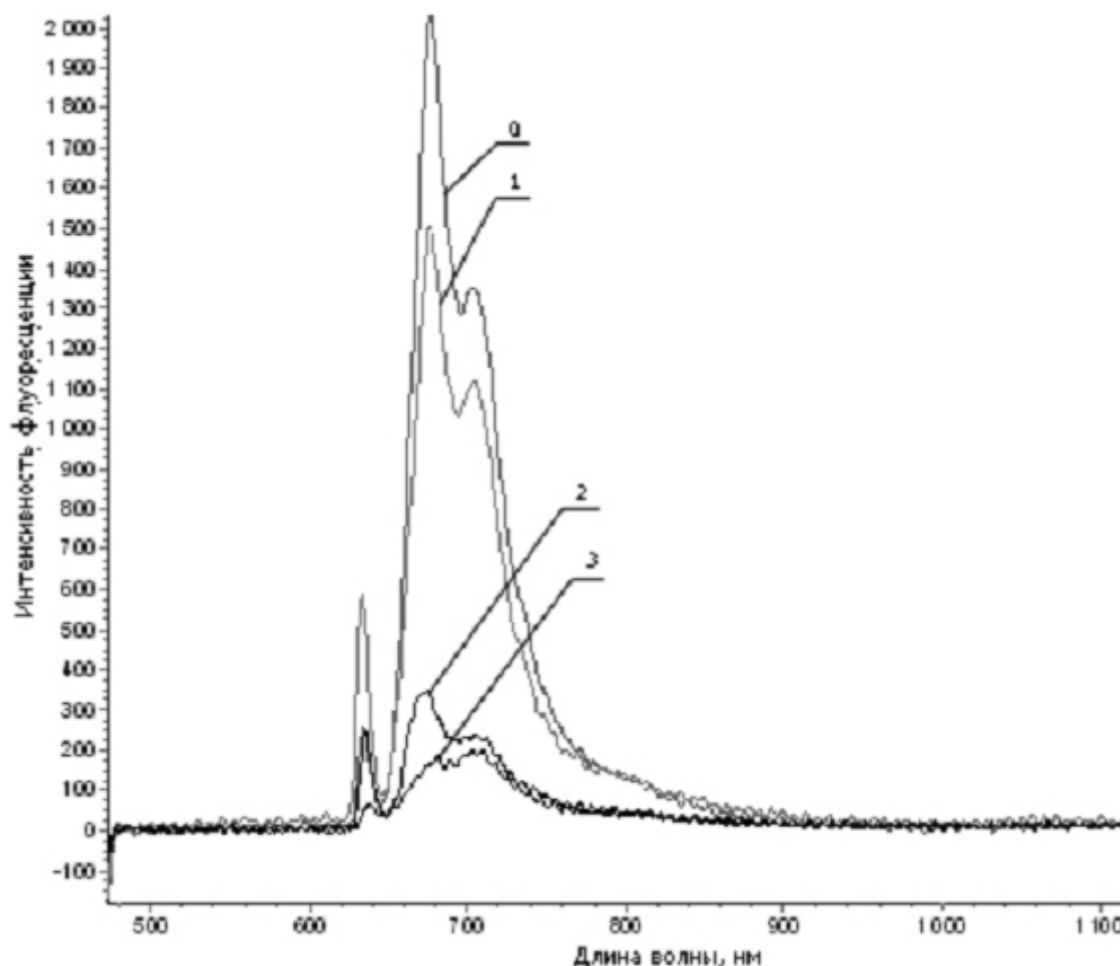


Рисунок 2.

Спектр флуоресценции "Бальзама Залевского" у пациента с хроническим риносинуситом. Кривые 0 и 1 получены при измерении флуоресценции накопленного препарата в поверхностях нижних носовых раковин у одного пациента до облучения ($\alpha = 405$ нм) с левой и правой стороны носа, кривые 2 и 3 соответственно после облучения, кривые совмещены на одном графике.

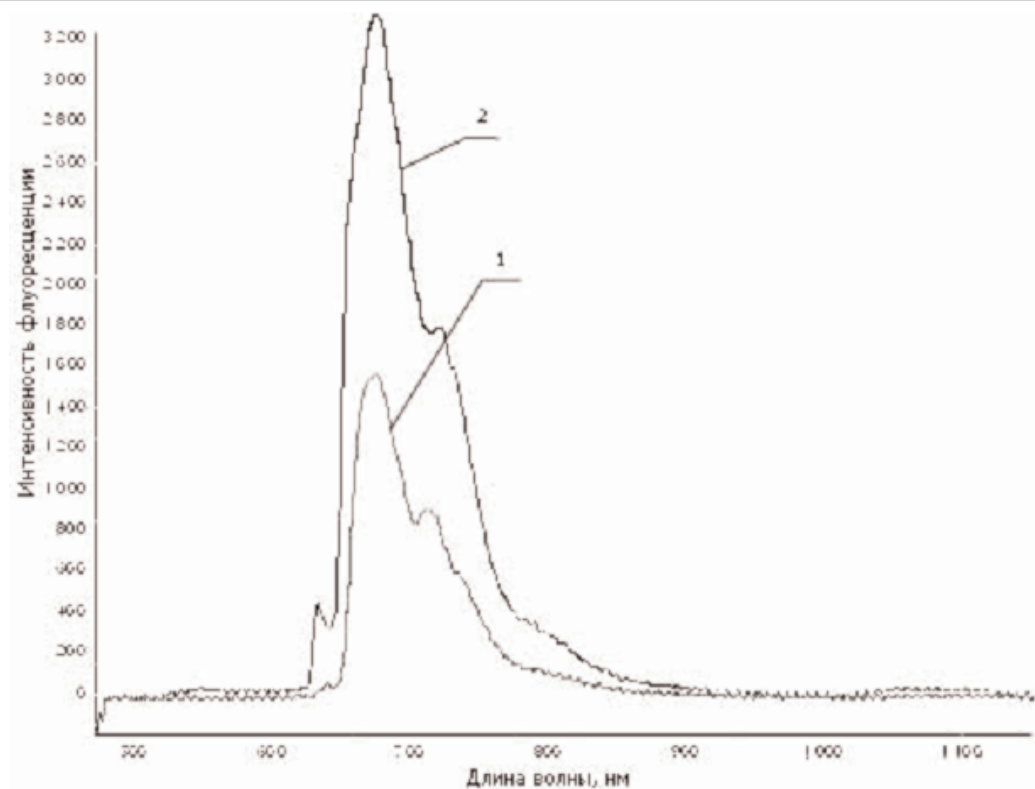


Рисунок 3.

Спектр флуоресценции 0,1% геля "Фотодитазин" у пациента с риносинуситом до облучения (кривая 2) и после облучения аппаратом ЛАХТА-“МИЛОН” с длиной волны 662 нм (кривая 1) (с одной поверхности).

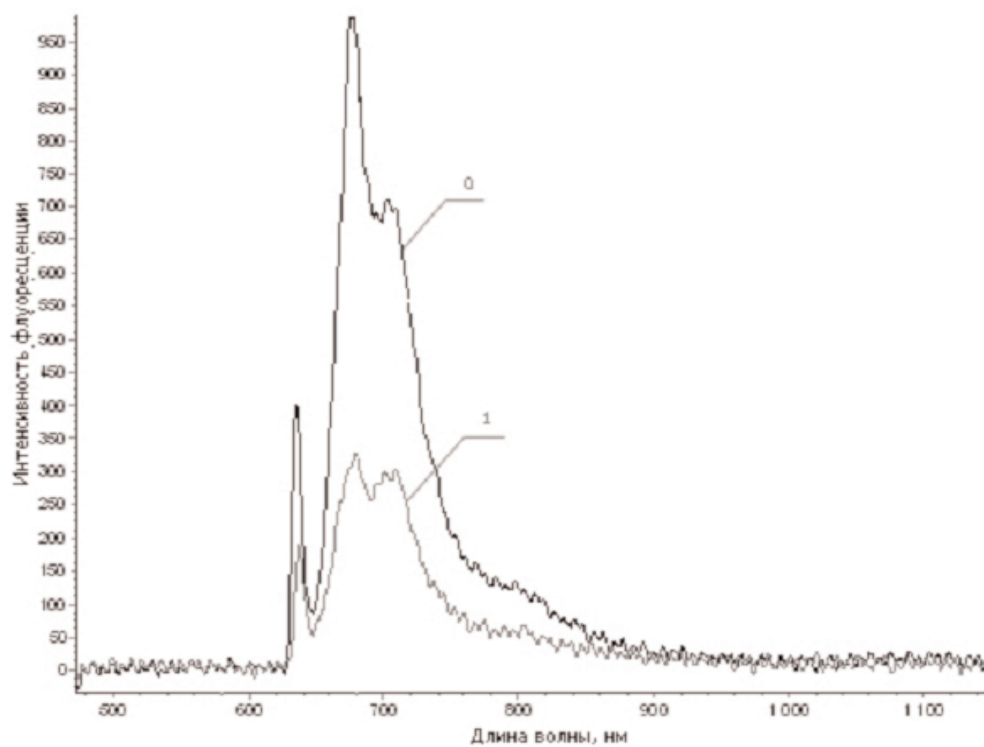


Рисунок 4.

Спектр флуоресценции 0,1% геля "Радахлорин" у пациента с хроническим тонзиллитом до облучения (кривая 0) и после облучения аппаратом ЛАХТА-“МИЛОН” с длиной волны 662 нм (кривая 1) (с одной поверхности).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Все исследованные препараты хлоринового ряда хорошо накапливаются в слизистой оболочке полости носа и ротоглотки у пациентов с заболеваниями ЛОР-органов.

Интенсивность флуоресценции препаратов хлоринового ряда достоверно снижается после облучения источниками света с длинами волн 405 нм и 662 нм, что говорит об эффективности их применения. Степень снижения флуоресценции показывает интенсивность образования синглетного кислорода.

Установлена эффективность ФДТ с аппликационным применением производных хлорина Е6 в оториноларингологии и осуществлен подбор источников излучения в синем и красном спектральных диапазонах для проведения ФДТ с изучаемыми фотосенсибилизаторами в виде базовой терапии и при комплексном лечении заболеваний ЛОР-органов.

По сравнению с другими методами лечения преимуществом данного варианта ФДТ являются безболезненность, отсутствие аллергических и других побочных реакций, позволяет снизить дозировку либо отменить медикаментозную терапию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Странадо Е.Ф., Толстых П.И., Коробов В.Н. (1999) Материалы 3-го Всероссийского симпозиума "Фотодинамическая терапия". – М., 83-91.
2. Juzeniene A., Peng Q., Moan J. (2007) Photochem. Photobiol. Sci., **6**(12), 1234-1245.
3. Henderson B., Dougherty T. (1992) Photochem. Photobiol., **55**(1), 145-157.
4. Бондаренко В.М., Коновалова Г.Н., Николаева Е.В., Кузиков А.Н., Лихачева Е.В. (2008) Лазерная медицина, **12**(2), 26-30.
5. Гейниц А.В., Цыганова Г.И. (2007) Лазерная медицина, **11**(4), 35.
6. Маркичев Н.А., Елисеенко В.И., Алексеев Ю.В., Армичев А.В. (2005) Лазерная медицина, **9**(2), 16-17.
7. Алексеев Ю.В., Николаева Е.В., Макарова Ю.Б., Армичев А.В. (2007) Сборник тезисов VI Международного конгресса KOSMETIK international, Москва, 102-104.
8. Цыб А.Ф., Каплан М.А., Попучиев Ю.С., Романенко Ю.С. (2007) в кн.: Клинические аспекты фотодинамической терапии, Москва, 43-44.
9. Армичев А.В., Алексеев Ю.В. (2006) Мат. научно-практ. конф. "Современные достижения лазерной медицины и их применение в практическом здравоохранении", Москва, 195.
10. Исаев В.М., Зенгер В.Г., Ашулов З.М., Наседкин А.Н., Решетников А.В. (2006) Мат. научно-практ. конф. "Современные достижения лазерной медицины и их применение в практическом здравоохранении", Москва, 144-145.
11. Лихачева Е.В., Алексеев Ю.В., Муравьев М.В., Красновский А.А., Пономарев Г.В., Терешкин Д.В., Николаева Е.В. (2008) Мат. четвертой международной научн. конф. БИО-ЭМИ-2008, Калуга, 200-201.

Поступила: 28. 02. 2011.

**EFFECTIVE PHOTSENSIBILIZATOR SELECTION FOR E.N.T.-ORGAN DISEASES
TREATMENT, BASED ON THEIR ACCUMULATION IN PATHOLOGICALLY
CHANGED TISSUES**

Y.V. Alexeev¹, E.V. Likhacheva¹, D.V. Tereshkin¹, G.V. Ponomarev², E.M. Mazur¹

¹State Research and Clinical Center for Laser Medicine Moscow, Studentcheskaya ul., 40, bld. 1,
121165 Russia; tel./fax: (499)249-36-52; e-mail: ziganova@yandex

²Russian Academy of Medical Science, Institute of Biomedical Chemistry, RAMS, Pogodinskaya ul. 10,
Moscow, 119121 Russia

Accumulation of photosensibilisators – derivatives of E6 chlorines ("Radachlorine", "Photoditazine", "Zelevsky's balsam") in the mucous membrane and selection of most effective sources of emission have been investigated in 30 patients with rhinosinusitis and 10 with tonsillitis. As a source of emission we used light emitting diode (LED) matrix device "ACT" (wavelength approximately 405 nm (Sore band)) and a laser device LAHTA-"MILON"-ML500-SP (wavelength – 662 nm). Drug accumulation in the mucous membrane and changes of their concentrations after emission were evaluated by changes of fluorescence, measured with a LESA-01-BIOSPEC spectrometer. The percent of fluorescence decrease ranged from 50% to 92.7%. This suggests intensive disintegration of photosensibilisators, and consequently, high therapeutic activity of this method. Effectiveness of this method is also confirmed by clinical results.

Key words: photodynamic therapy, chlorin E6, spectroscopy, rhinosinusitis, tonsillitis.