



Разработка новых препаратов для фотодинамической терапии ран, ожогов и трофических язв на основе наноразмерных комплексов амфифильных полимеров с порфириновыми фотосенсибилизаторами

Участники

работы:
МГУ

ИХФ РАН

проф. А.Б. Соловьева

кхн Н.Н. Глаголев

кхн Т.С. Зархина

кхн В.А. Тимофеева

нс Н.А. Аксенова

Центр лазерной медицины

проф. П.И. Толстых

дхн Н.С. Мелик-Нубаров

студент Т.М. Жиентаев

кхн А.А. Рахнянская

РОНЦ им. Н.Н. Блохина

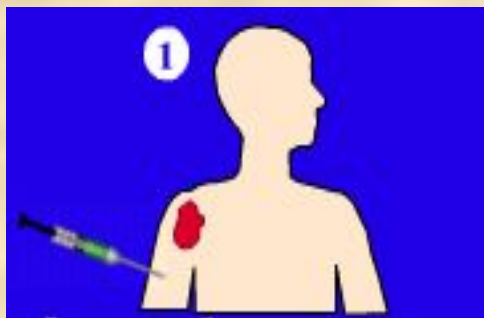
дф-мн А.В. Иванов

дф-мн А.А. Штиль

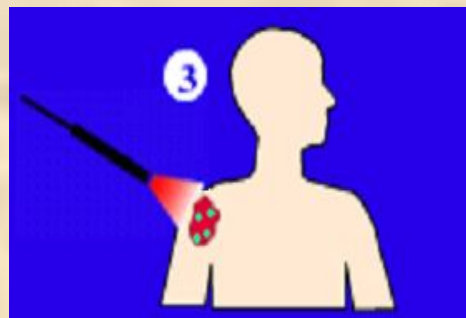
Метод ФДТ, разработанный в 60-годы прошлого века для лечения злокачественных опухолей, основан на селективном воздействии лазерного излучения на предварительно обработанные фотосенсибилизатором (ФС) больные ткани.

В медицинской практике сейчас используются порфириновые фотосенсибилизаторы – наиболее активные и биологически совместимые с человеческим организмом тетрапиррольные соединения.

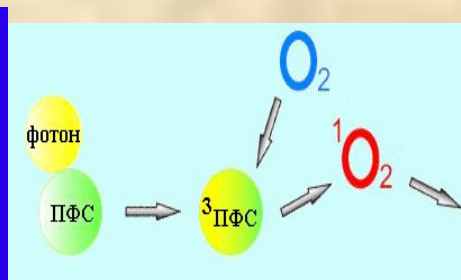
Принципиальная схема фотодинамической терапии



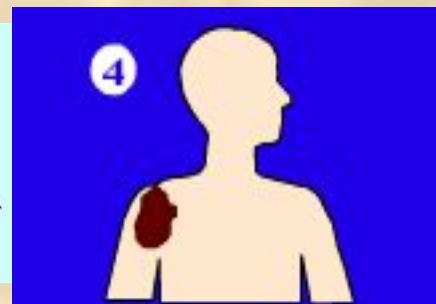
ПФС вводится внутривенно, либо применяется наружно в виде геля.



Затем проводят облучение пораженной области видимым светом.



ПФС переходит в возбужденное состояние, активирует молекулярный кислород ...



...который разрушает больные клетки.

Для создания гелей и мазей, содержащих ПФС, используют нетоксичные полимеры, не участвующие в процессе ФДТ.

Ранее было показано, что в присутствии некоторых амфифильных полимеров эффективность ПФС при фотодинамическом воздействии на культуры опухолевых клеток, а также опухоли поверхностной локализации у лабораторных животных возрастает в 10 - 30 раз (патент РФ 2314806). Использовали культуры нормальных и опухолевых клеток шести разных типов и 1000 крыс линии Вистар.

Основная задача данной работы – создание препаратов на основе комплексов наноразмерных агрегатов порфиринов с амфифильными полимерами для фотодинамической терапии гнойных ран, осложненных ожогов, трофических язв.

Работа развивалась в трех направлениях – изучение механизмов влияния амфифильных полимеров на активность ПФС в модельных процессах фотоокисления, при фотодинамическом воздействии на клетки и исследование эффективности комплексов ПФС-АП при ФД-воздействии на раневые инфекции у лабораторных животных (крысы), а также при лечении хронических гнойных ран у больных.

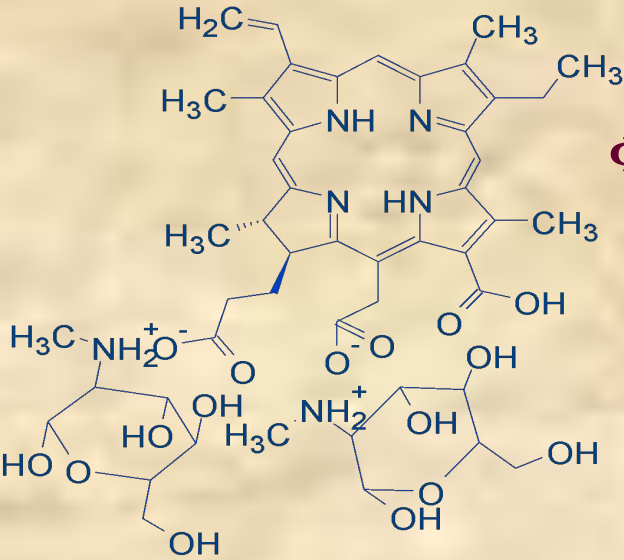
Объекты и методы

В качестве фотосенсибилизаторов использовали **димегин** и **фотодитазин** - препарат, применяемый сейчас в клинической практике.

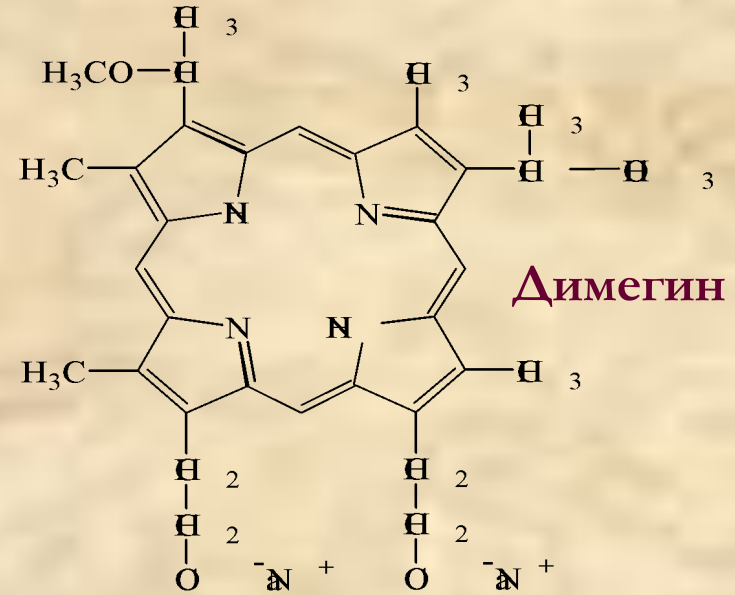
Использовали три группы **амфифильных полимеров** разной мол. массы и химической природы, в том числе плюроники.

- 1. Модельные условия** – фотоокисление триптофана.
- 2. Испытания на животных:** выполнены на 100 беспородных крысах-самцах с массой тела 250 ± 10 г. Объектом ФД-воздействия служила огнестрельная мягкотканная инфицированная рана в области средней трети правого бедра животных.
- 3. Эффективность гелей на основе комплексов полимер-фотодитазин** исследовали при лечении **45 больных**.

I. Фотосенсибилизаторы:



ФОТОДИТАЗИН



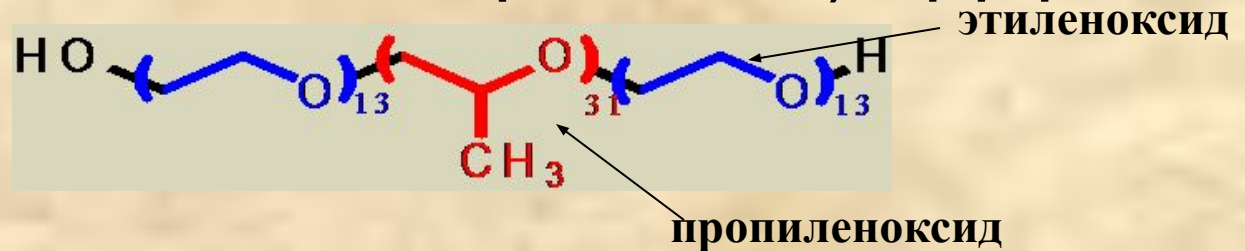
ДИМЕГИН

N-метил-ди-D-глюкаминовая соль хлорина еб

Динатриевая соль 2,7,12,18-тетраметил-3,8-ди(1-метоксиэтил)-13,17-ди(2-оксикарбонил этил) порфирина

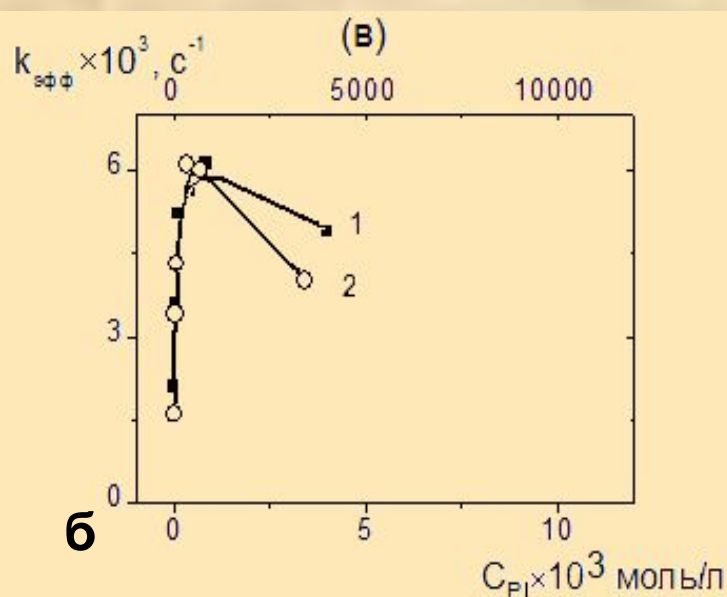
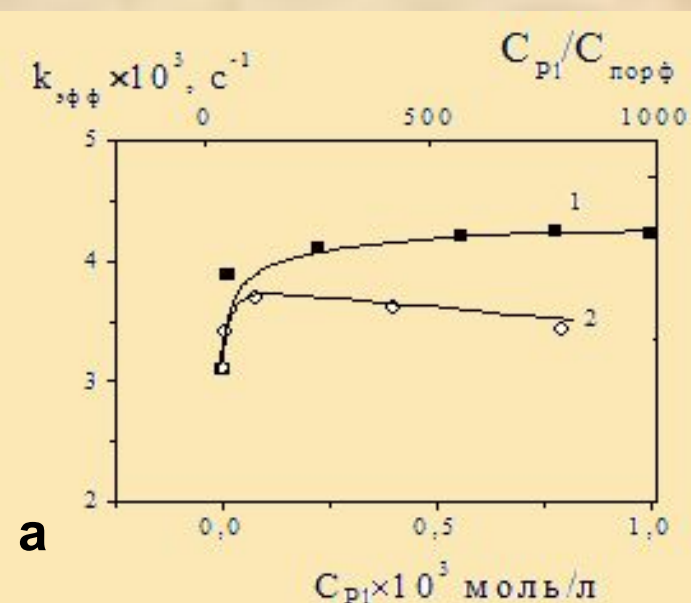
2. Полимеры

1. Плуороник



2. Поливиниловый спирт — CH₂ — CH —
OH

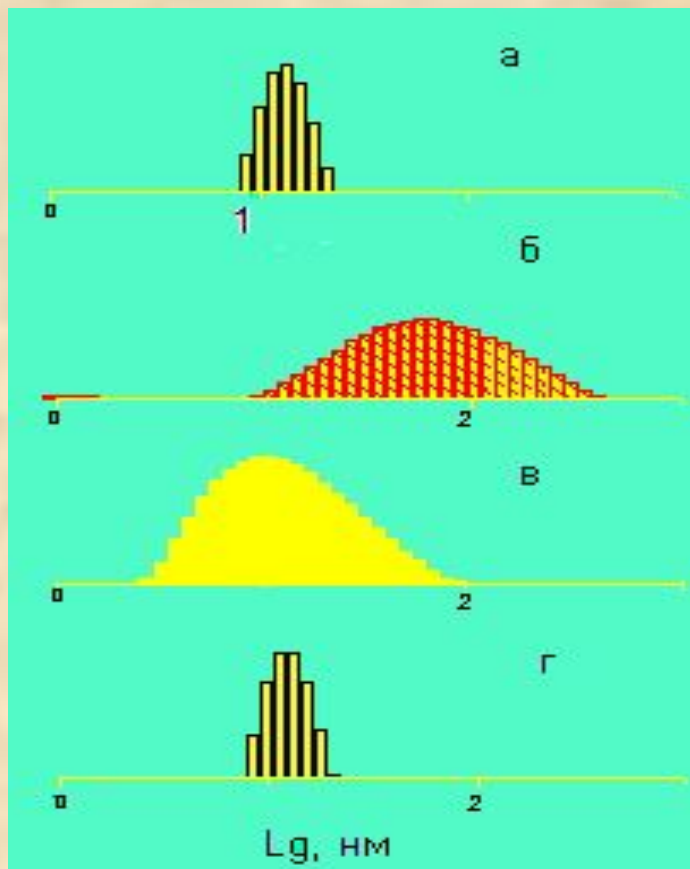
I. Влияние плуроников на кинетику фотосенсибилизированного окисления триптофана



Зависимость константы скорости фотоокисления триптофана (5×10^{-5} моль/л), в присутствии димегина (а) и фотодитазина (б) от концентрации плуроников Р85 (1), F127 (2).
[ПФС] - 10^{-6} моль/л.

Таким образом, солубилизация димегина повышает его активность в 1,5 раза, а фотодитазина в 6 раз. Соотношение концентраций плуроник/димегин при этом составляет 20:1; для фотодитазина – 100:1. С увеличением концентрации плуроников их влияние на активность фотодитазина в модельных условиях резко уменьшается.

Влияние плуроников на агрегацию димегина и фотодитазина в воде по данным светорассеяния

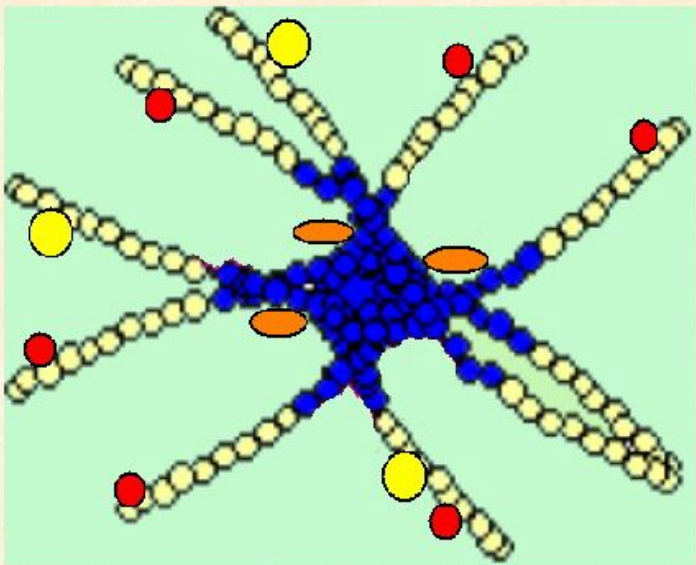


Распределение по размерам мицелл плуроника F127 (7.9×10^{-5} моль/л) (а), (б); мицелл плуроника в присутствии 10^{-6} моль/л димегина (в); агрегатов димегина в водном растворе (10^{-6} моль/л), плуроника в присутствии фотодитазина (г). Фосфатный буфер, 37°C . [ФД, ДМ] - 10^{-6} моль/л. При увеличении концентрации плуроника до 10^{-3} моль/л средний размер мицелл не меняется. Размер агрегатов фотодитазина < 1 нм.

Размер мицелл плуроника, содержащих солюбилизированный фотодитазин в водном растворе составляет 10 - 15 нм, размер мицелл плуроника с димегином ~ 100 нм. Присутствие фотодитазина не меняет размеров мицелл плуроника.

Ì áõàí èçì áçàèì í äåéñò áèÿ ï ëþ ðí í èéí â ñ Ĩ Ô Ñ

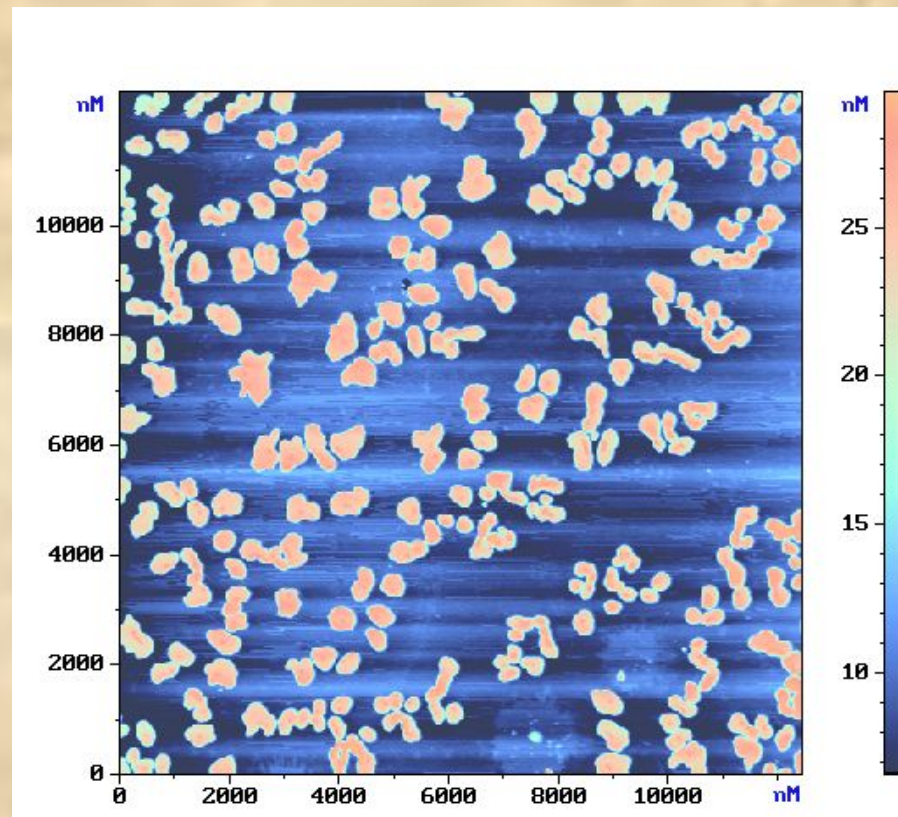
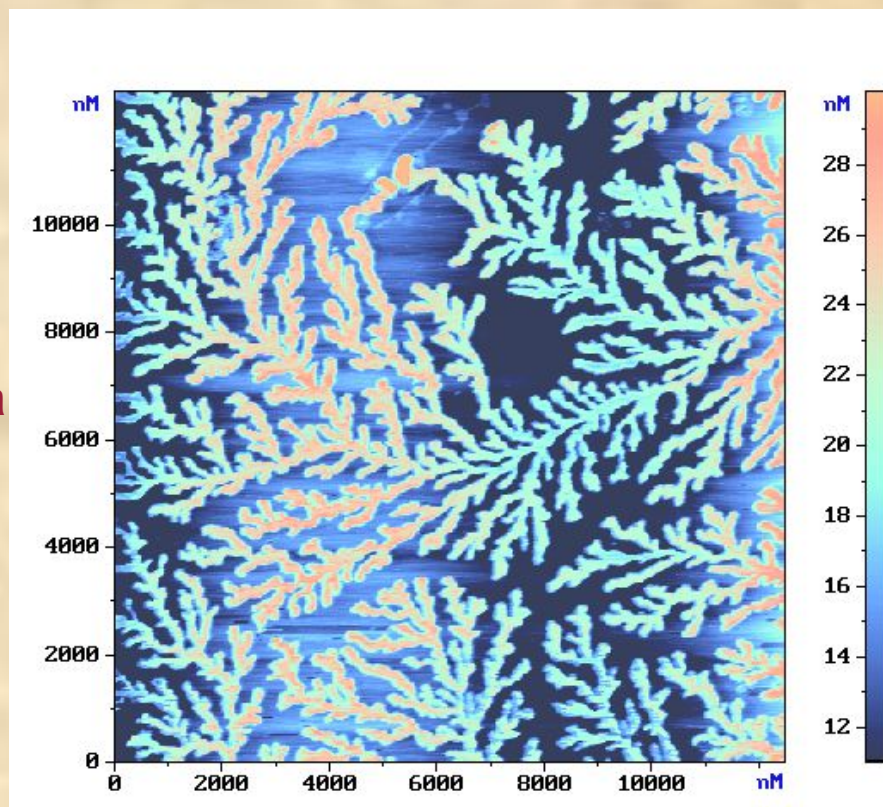
Đí ñò ô î ò í ê à ò à è è ò è ÷ ã ñ ê í é à è ò è á í î ñ ò è ï ï ð ò è ð è í í â â ï ð è ñ ò ñ ò â è è ï ë þ ð í í è é í â ì î æ ã ò á ú ò ù ñ â ÿ ç à í ê à ê ñ ý ò ô å è ò í ì è ò ä è è ÿ ð í í ã ï ê à ò à è è ç à ĩ ð è ê í í ò á í ò ð è ð í â à í è è ê à ò à è è ç à ò í ð à è ñ ó á ñ ò ð à ò à â í ã í í é ì è ö ä è è á. Ê ð í ì á ò í ã ï, ñ ë þ á è è ç à ò è ÿ ì î æ ã ò á ú ç ú â à ò ù ò í á í ü ø á í è á ð à ç í á ì í ê ä è ó è ÿ ð í ú õ à ã ð á ã à ò í â, ê í ò í ð ú á í á ê í ò í ð ú á ĩ ï ð ò è ð è í ú í á ð à ç ò þ ò â â í á í í é ñ ð á á á. Ĩ ð è à ã ð á ã à ö è è à è ò è á í î ñ ò ù ĩ ï ð ò è ð è í í â ò í á í ü ø á ã ò ñ ÿ.



- - ä è ì á ä è í
- - ô î ò í ä è ò à ç è í
- - ò ð è ì ò í ô á í

Äñëääñò á è á ð à ç í í é ä è ä ð í ò í á í í ñ ò è ä è ì á ä è í è ò í ò í ä è ò à ç è í ì í ã ò è í ê à è è ç í â à ò ü ñ ÿ â ð à ç í ú õ í á è ä ñ ò ÿ ò ì è ö ä è è ĩ ë þ ð í í è è à.

Влияние фотодитазина на кристаллизацию плюроника (по данным АСМ)



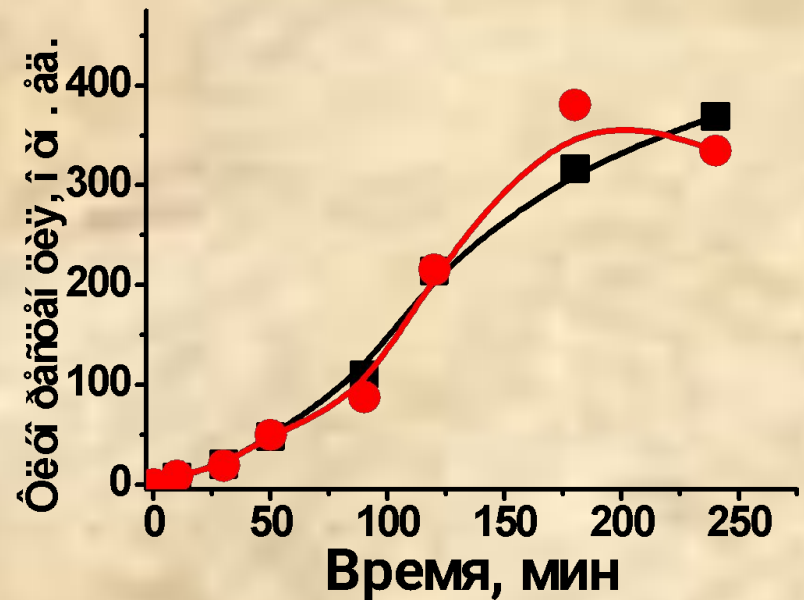
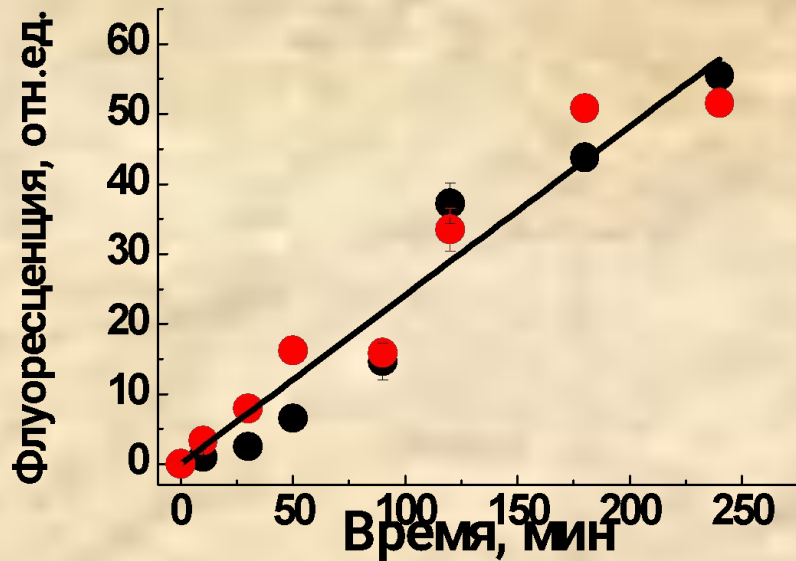
Рельеф участка поверхности (7x7мкм) плюроника F-127 (а) и его комплекса с фотодитазином (б), полученных при кристаллизации из воды на слюде.

Агрегаты полимер-порфирина в твердой фазе достигают размеров 100-500 нм, размеры ассоциатов фотодитазина ≤ 100 нм.

ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ АМФИФИЛЬНЫХ ПОЛИМЕРОВ НА ФОТОИНДУЦИРОВАННУЮ ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ СЕНСИБИЛИЗАТОРОВ

- ▣ *Влияние на проницаемость плазматической мембраны (повышение содержания порфиринов в клетке);*
- ▣ *Стабилизация дефектов (пор) в мембране, вызванных воздействием синглетного кислорода.*
- ▣ *Влияние на клеточный метаболизм (торможение репаративных процессов);*

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМЕРОВ НА НАКОПЛЕНИЕ ФОТОДИТАЗИНА В КЛЕТКАХ



(а)

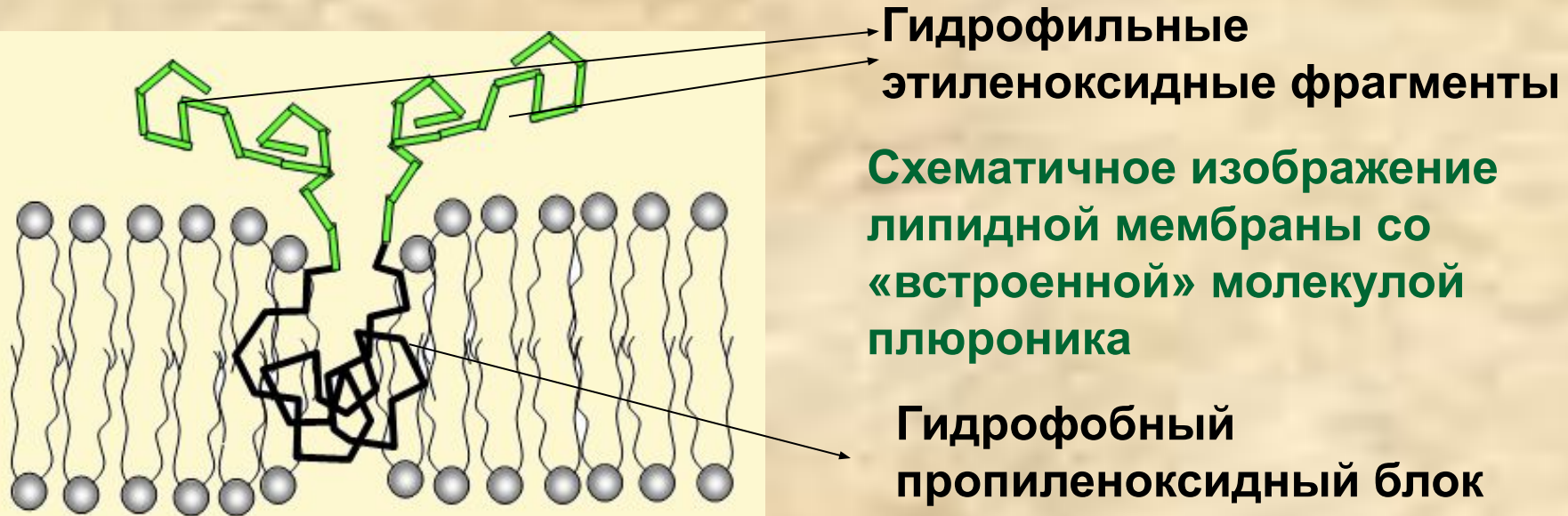
■ - в отсутствие полимеров

● - в присутствии 0,1% Р85 (а) и ПВС (б)

(б)

Полимеры не влияют на количество фотодиазотизированных клеток

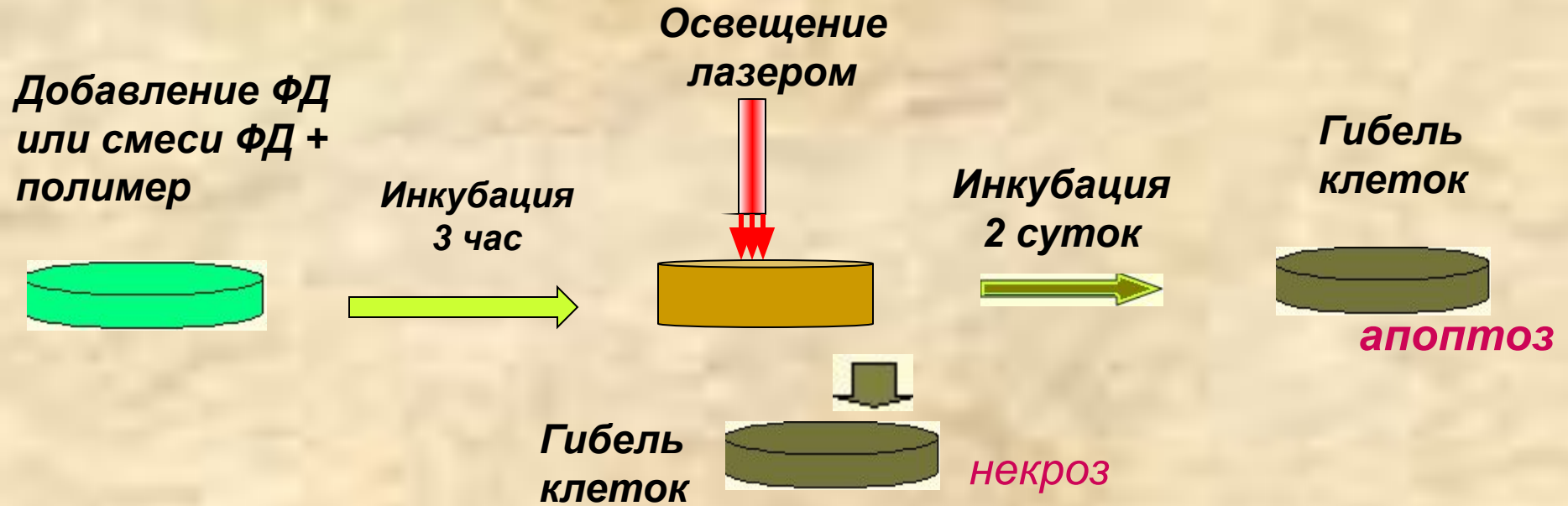
ВЛИЯНИЕ МИЦЕЛЛ ПЛЮРОНИКА F127 НА РАЗМЕР ПОР МОДЕЛЬНОЙ ЛИПИДНОЙ МЕМБРАНЫ



Оказалось (по данным кинетики «вытекания карбоксифлуоресцеина»), что плюроники не влияют на размер пор липидных мембран, возникающих под действием $^1\text{O}_2$.

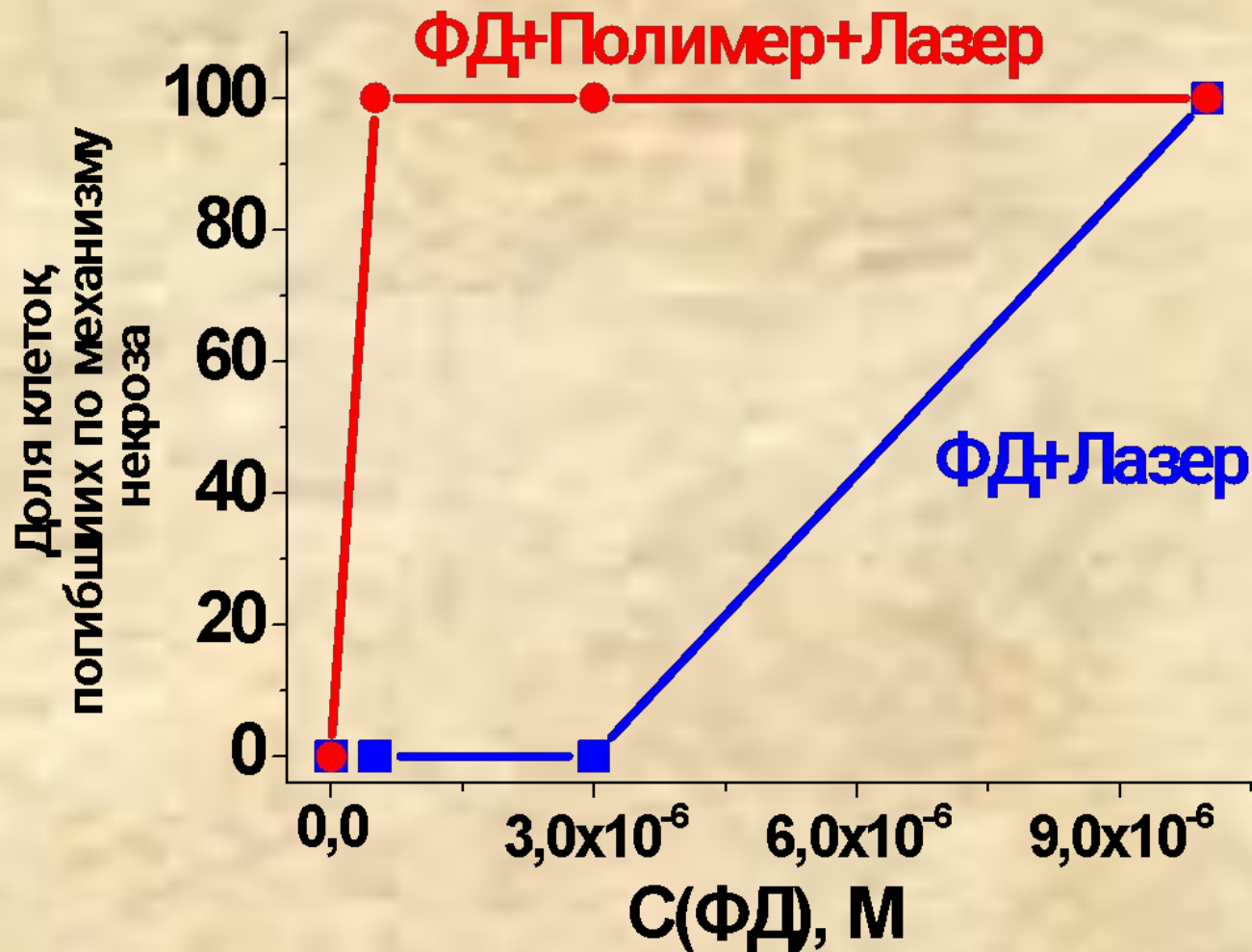
- Если влияние полимеров на фотоцитотоксичность ПФС обусловлено воздействием на клеточный метаболизм, то эффективность воздействия должна зависеть от длительности контакта полимеров и ПФС с клетками.

Схема эксперимента по изучению влияния времени экспонирования клеток с плюронином F127 и фотодитазином на величину обнаруженного эффекта.



Оказалось, что эффект проявляется, если добавить полимер вместе с ФД за 3 часа до облучения. Если после инкубации отмыть полимер перед освещением, эффект исчезает или проявляется в малой степени. Добавление полимера после освещения не меняет процент гибели клеток.

Механизмы гибели опухолевых клеток при ФДТ



В присутствии амфифильных полимеров клетки гибнут по механизму некроза

2. Заживление огнестрельных ран у крыс при фотодинамической терапии с использованием комплексов фотодитазин-поливиниловый спирт

Группа животных	Исчезновение признаков воспаления (сутки)	Очищение от детрита (сутки)	Появление грануляций (сутки)	Полное заживление (сутки)
Контрольная (хлоргексидин)	13,3±1,4	13,0±0,5	14,1±0,9	34,3±1,7
1-я опытная (ХЛ-раствор, 0,05мг/мл)	12,2±1,3	12,9±1,1	13,3±1,7	33,8±1,3
2-я опытная (ФД-раствор, 10мг/мл)	11,4±1,4	12,7±1,5	12,4±1,1	32,1±1,6
3-я опытная (ХЛ-гель, 0,05мг/мл)	10,9±1,5	11,2±1,6	11,6±1,3	31,8±1,5
4-я опытная (ФД-гель, 10мг/мл)	7,3±0,9	6,5±0,1	6,1±0,4	25,2±1,5
5-я опытная (гель ПВС-ФД, 0,1мг/мл)	5,8±0,69	5,3±0,7	5,5±0,3	22,2±0,6

3. Комплексы полимер-фотодитазин в лечении гнойных ран у больных

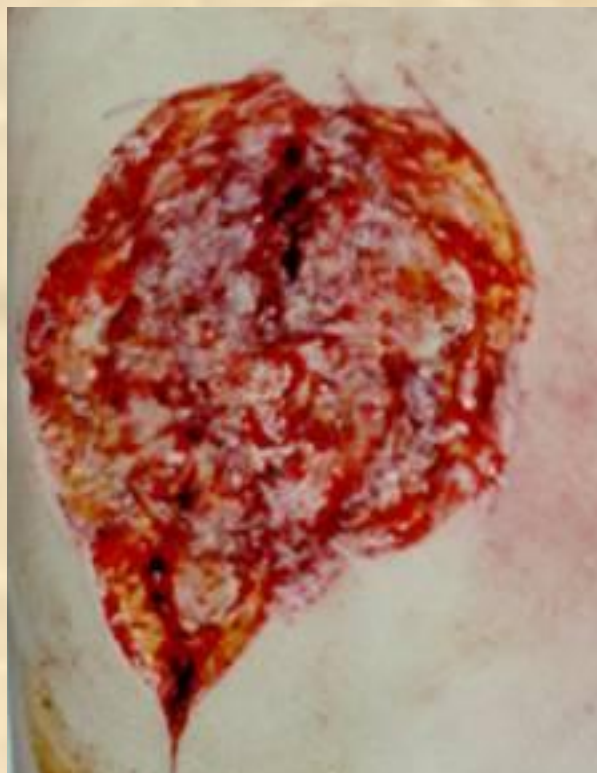
3.1. Распределение больных по группам в зависимости от лечения фармакологических форм фотодитазина

№	Методы лечения	Количество больных	
		Количество	Доля от общего количества, %
1	Традиционное лечение (контрольная группа)	35	26.9
2	ФДТ с использованием 1% раствора фотодитазина	20	15.4
3	ФДТ с использованием 1% фотодитазина в геле	30	23.1
4	Гель ПВС-ФД (0,1% фотодитазин)	45	34.6
Всего		130	100

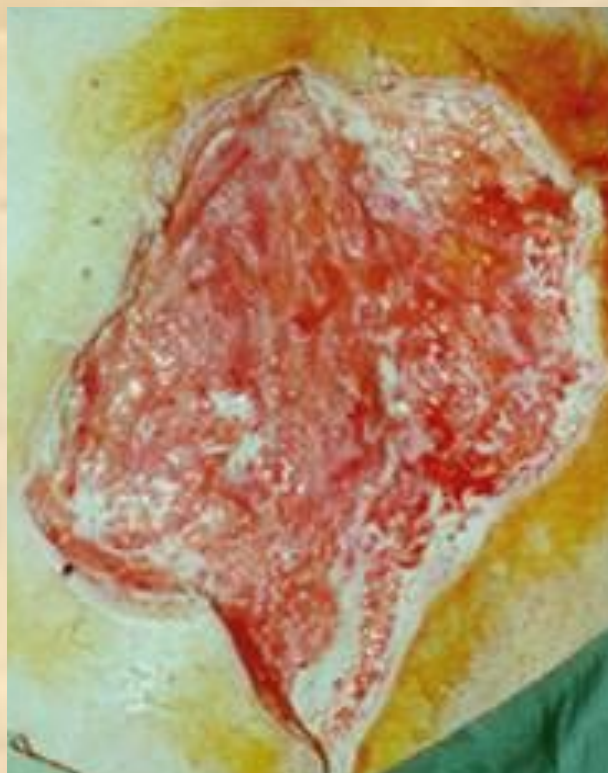
3.2. Сроки очищения ран от гнойно-некротических масс, появления грануляций и краевой эпителизации

Метод лечения	Сроки, сутки		
	Очищение	Появление грануляций	Краевая эпителизация
Традиционное лечение	6,5±0,7	7,8±0,6	7,8±1,2
ФДТ с использованием 1% раствора фотодитазина в 25%-ном димексиде	4,1±0,5	4,7±0,4	6,1±0,4
ФДТ с использованием 1% фотодитазина в геле	3,6±0,3	3,6±0,3	5,1±0,5
Гель ПВС-ФД (0,1% фотодитазин)	2,3±0,5	2,4±0,5	4,0±0,7

**Применение комплекса плюроник F127 -
фотодитазин (0,1%ФД) при лечении гнойно-
некротической раны лопаточной области**



**Исходное состояние
после некрэктомии**



**На 2-сутки после
воздействия
комплекса и
облучения (рана
очистилась)**



**На 9 - сутки
произошла
эпителизация**

ВЫВОДЫ

- В процессе фотоокисления триптофана наиболее активны комплексы плюроник-фотодитазин, средние размеры которых составляют 15-20 нм, менее активны системы плюроник-димегин, средние размеры которых 40-100 нм;**
- Наиболее вероятный механизм эффективности наноразмерных комплексов плюроник-порфирина в ФДТ- влияние на клеточный метаболизм;**
- В присутствии плюроника гибель клеток протекает только по механизму некроза;**
- Комплексы амфифильных полимеров с фотодитазином эффективнее ряда имеющихся средств лечения гнойных ран и кожных повреждений;**
- Использование комплексов амфифильный полимер-фотодитазин наряду с повышением эффективности ФД-воздействия позволяет в 10-100 раз снизить концентрацию фотосенсибилизатора.**