



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

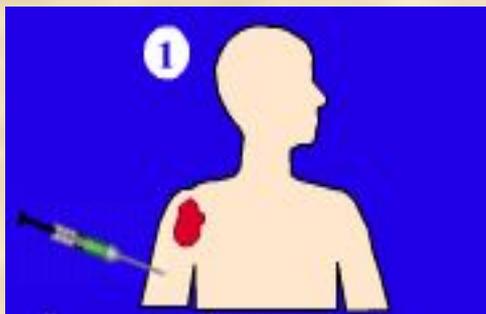
дф-мн А.В. Иванов

дф-мн А.А. Штиль

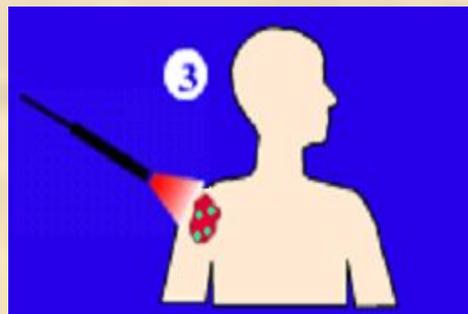
Метод ФДТ, разработанный в 60-годы прошлого века для лечения злокачественных опухолей, основан на селективном воздействии лазерного излучения на предварительно обработанные фотосенсибилизатором (ФС) больные ткани.

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

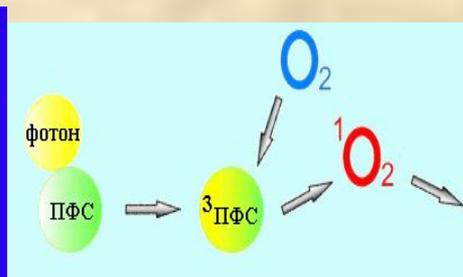
Принципиальная схема фотодинамической терапии



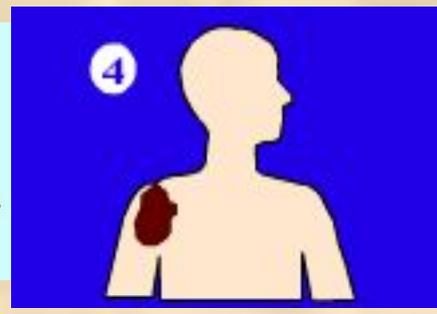
ПФС вводится внутривенно, либо применяется наружно в виде геля.



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.

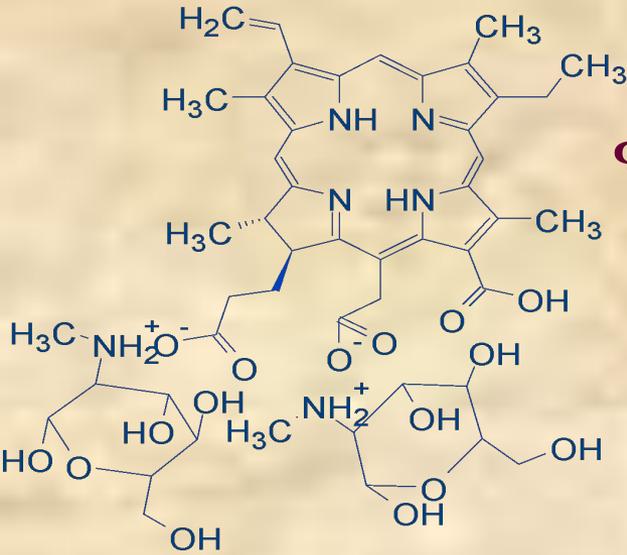
Объекты и методы

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

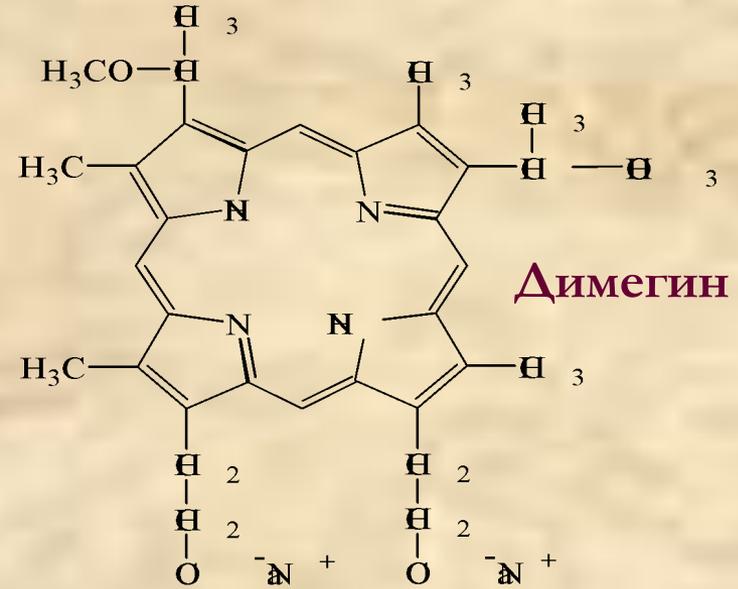
Использовали три группы **амфифильных полимеров** разной мол. массы и химической природы, в том числе плюроники.

- 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**.

1. Фотосенсибилизаторы:



ФОТОДИТАЗИН



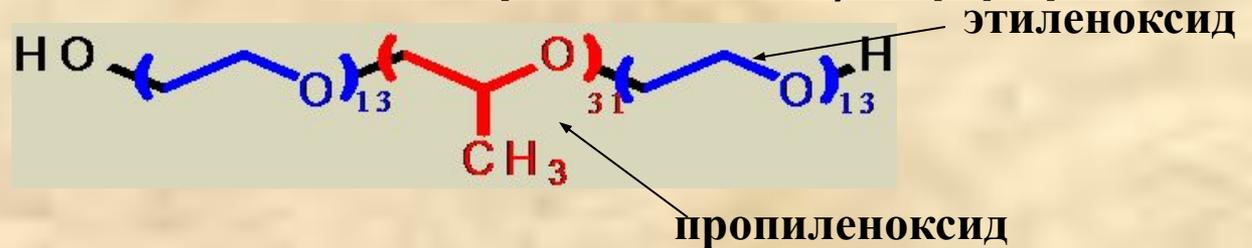
ДИМЕГИН

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

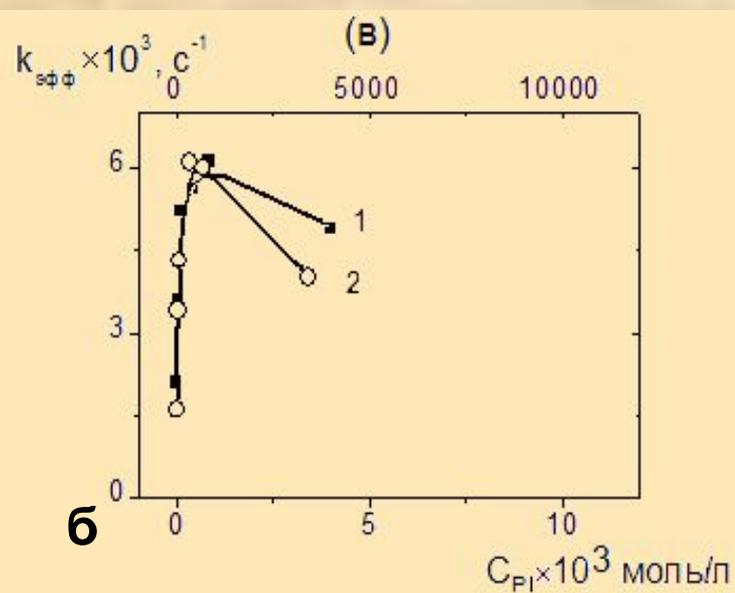
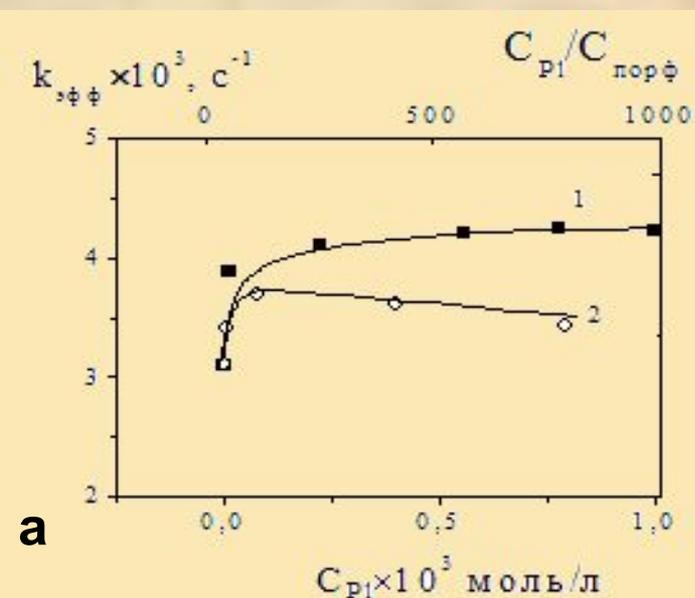
2. Полимеры

1. Плуороник



2. Поливиниловый спирт $\text{—CH}_2\text{—CH—}$
 OH

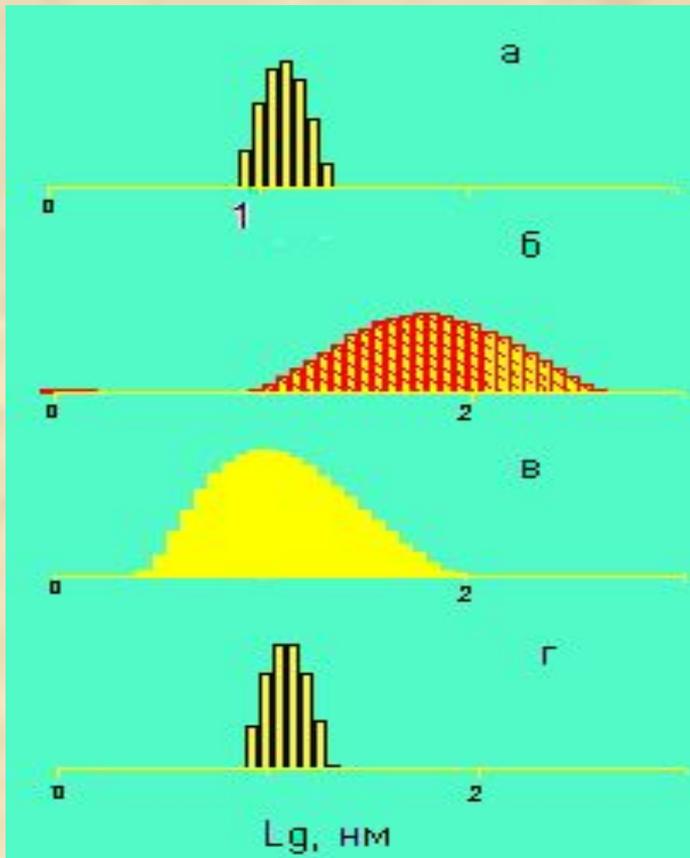
I. Влияние плуроников на кинетику фотосенсибилизированного окисления триптофана



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

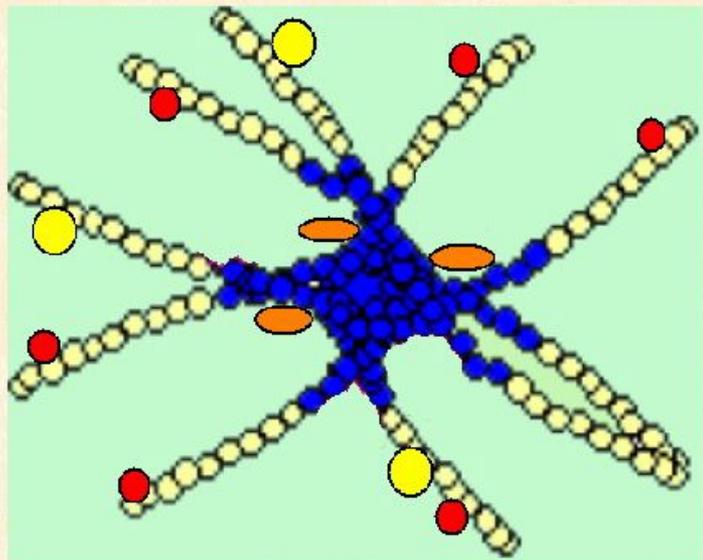


Распределение по размерам мицелл плуроника F127 (7.9×10^{-5} моль/л) (а), (б); мицелл плуроника в присутствии 10^{-6} моль/л димегина (в); агрегатов димегина в водном растворе (10^{-6} моль/л), плуроника в присутствии фотодитазина (г). Фосфатный буфер, 37°C. [ФД, ДМ] - 10^{-6} моль/л. При увеличении 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 ~100нм. Присутствие фотодитазина не меняет размеров мицелл плуроника.

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

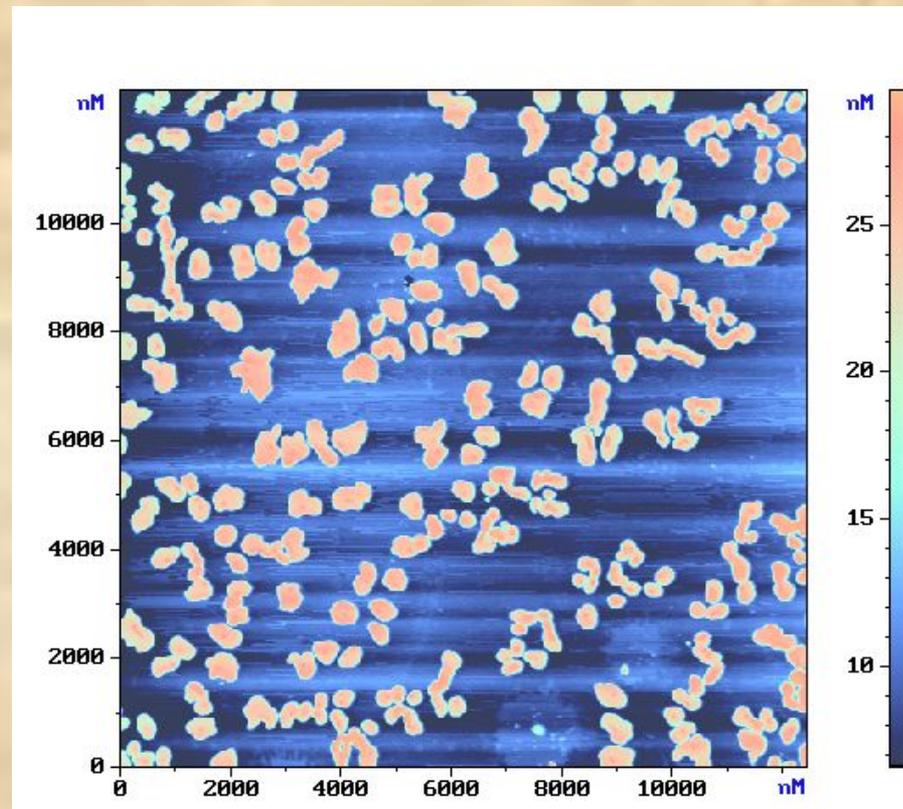
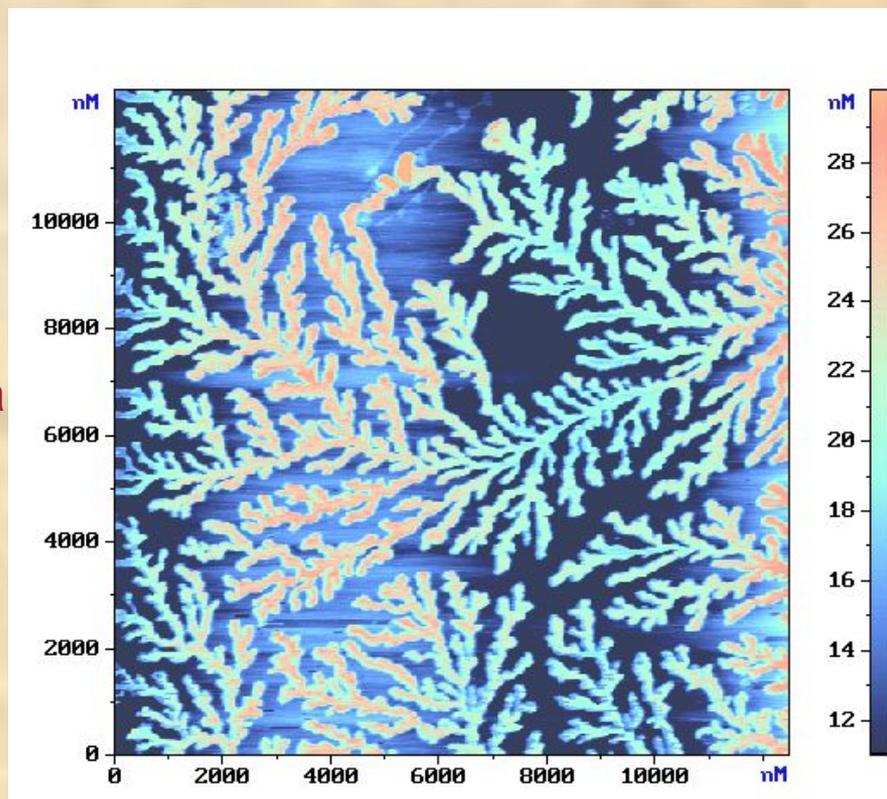
Đí ñò ô î ò í ê à ò à è è ò è ÷ ã ñ ê í é à è ò è á í î ñ ò è ï ï ð ò è ð è í í â â ï ð è ñ ò ñ ò á è è ï ë þ ð í í è é í â ì î æ ã ò á ú ò ù ñ ã ÿ ç à í ê à ê ñ ý ò ô á è ò í ì ì è ö ä è ë ÿ ð í í ã ï ê à ò à è è ç à ĩ ð è ê í í ö á í ò ð è ð í á à í è è ê à ò à è è ç à ò í ð à è ñ ó á ñ ò ð à ò à â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

Á ñ è á á ñ ò á è á ð à ç í í é ä è ä ð í ô í á í î ñ ò è á è ì á ä è í è ô î ò í ä è ò à ç è í ì î á ò ò é í ê à è è ç í á à ò ü ñ ÿ á ð à ç í ú õ í á è á ñ ò ÿ ò ì è ö ä è ë ĩ ë þ ð í í è é à.

Влияние фотодитазина на кристаллизацию плюроника (по данным АСМ)



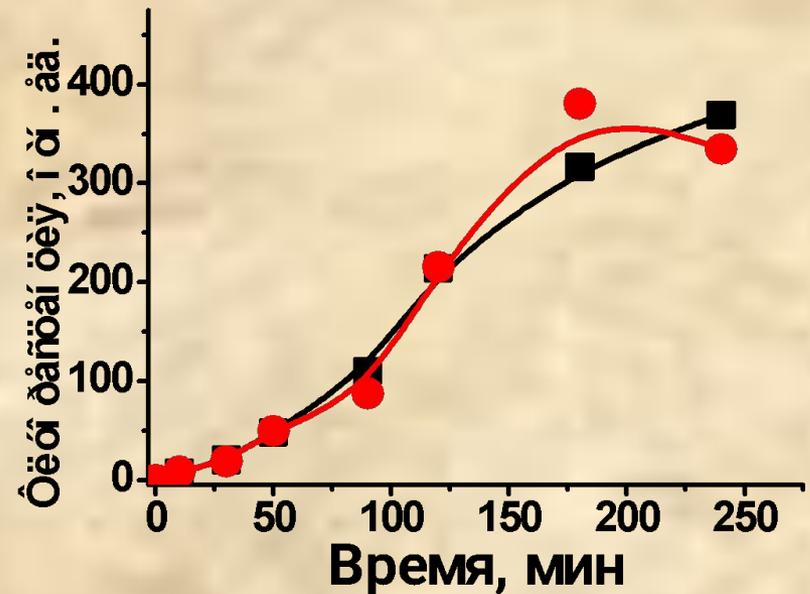
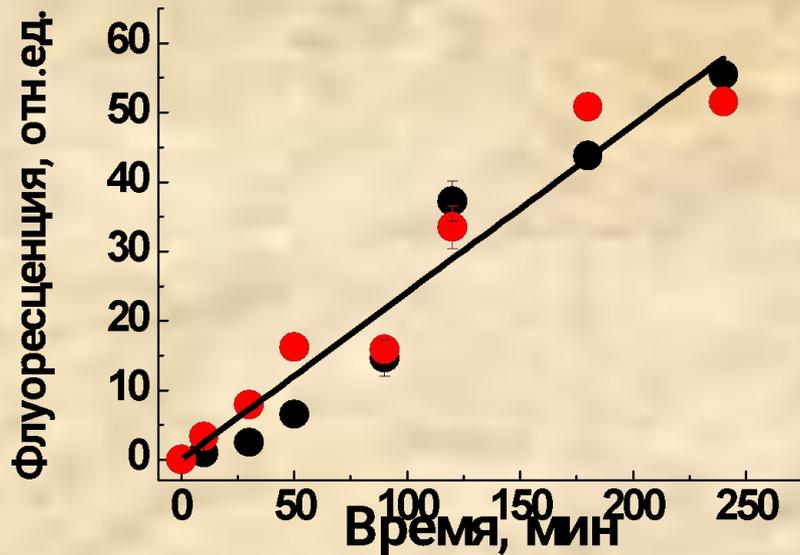
Рельеф участка поверхности (7x7мкм) плюроника F-127 (а) и его комплекса с фотодитазином (б), полученных при кристаллизации из воды на слюде.

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)

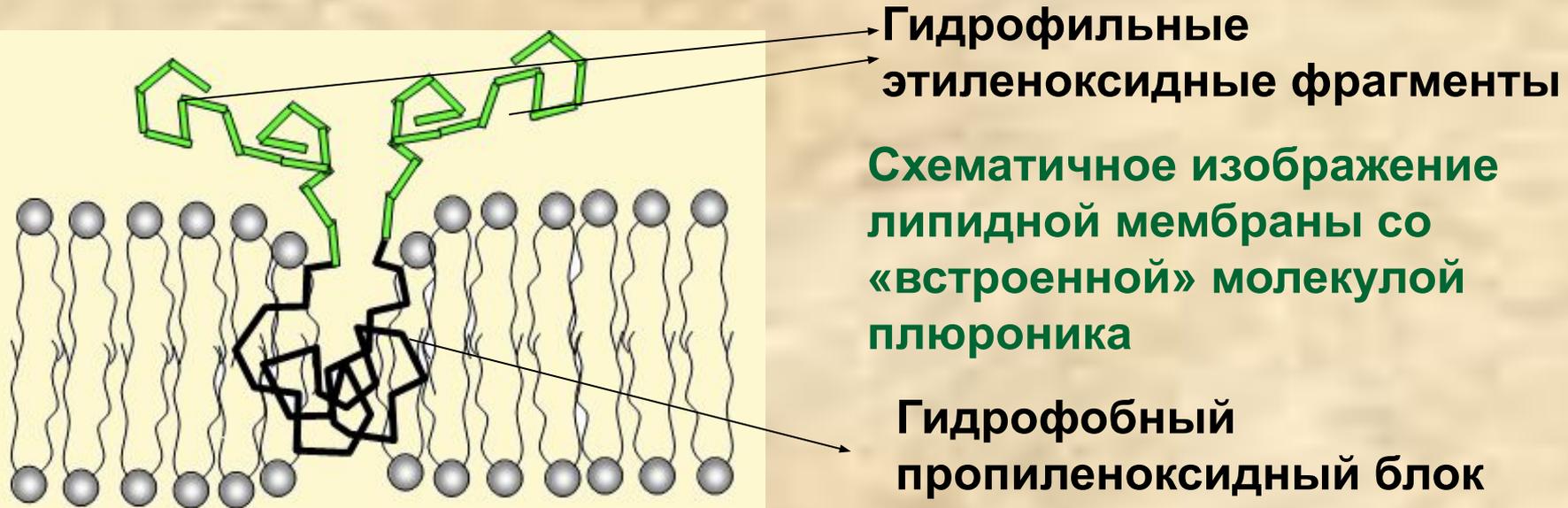
■ - в отсутствие полимеров

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

(б)

Полимеры не влияют на количество фотодиазина, проникшего в клетки

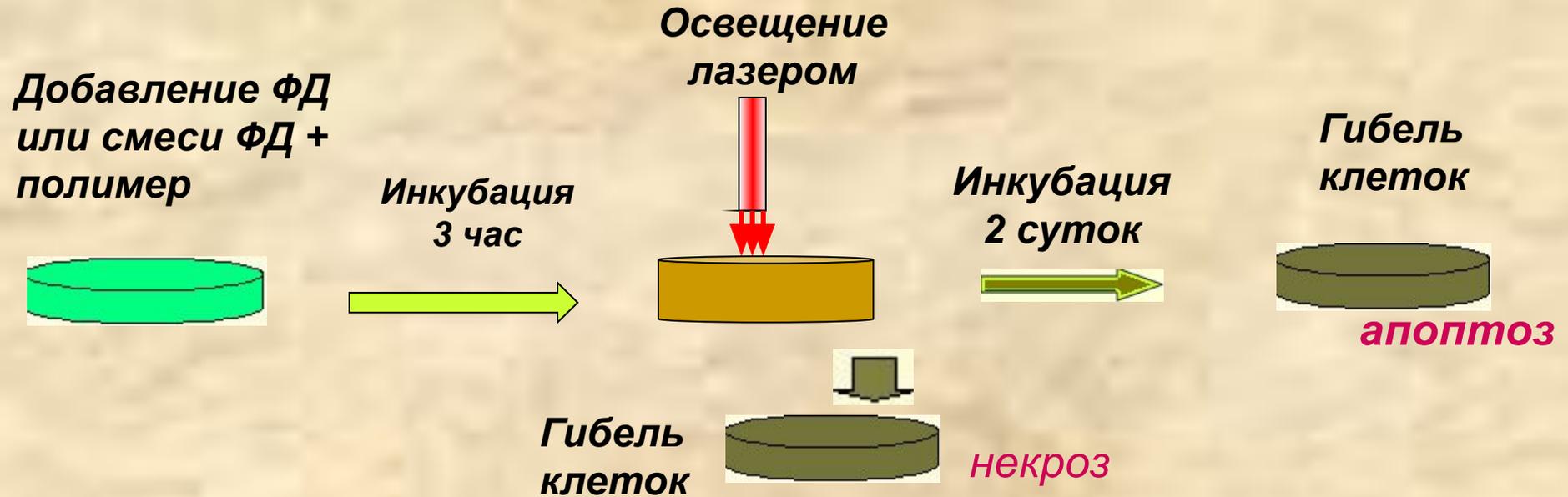
ВЛИЯНИЕ МИЦЕЛЛ ПЛЮРОНИКА F127 НА РАЗМЕР ПОР МОДЕЛЬНОЙ ЛИПИДНОЙ МЕМБРАНЫ



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

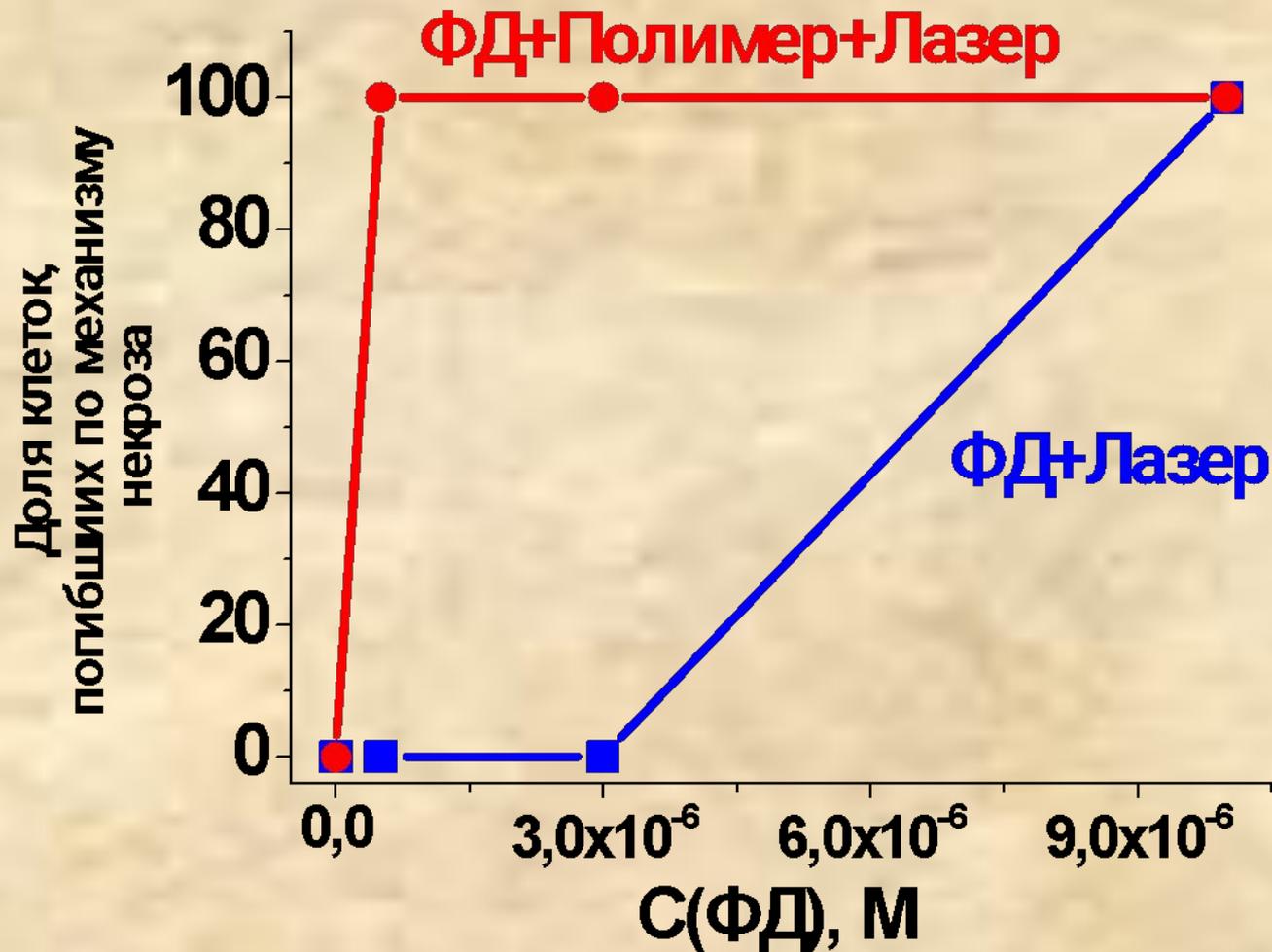
- Если влияние полимеров на фотоцитотоксичность ПФС обусловлено воздействием на клеточный метаболизм, то эффективность воздействия должна зависеть от длительности контакта полимеров и ПФС с клетками.

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

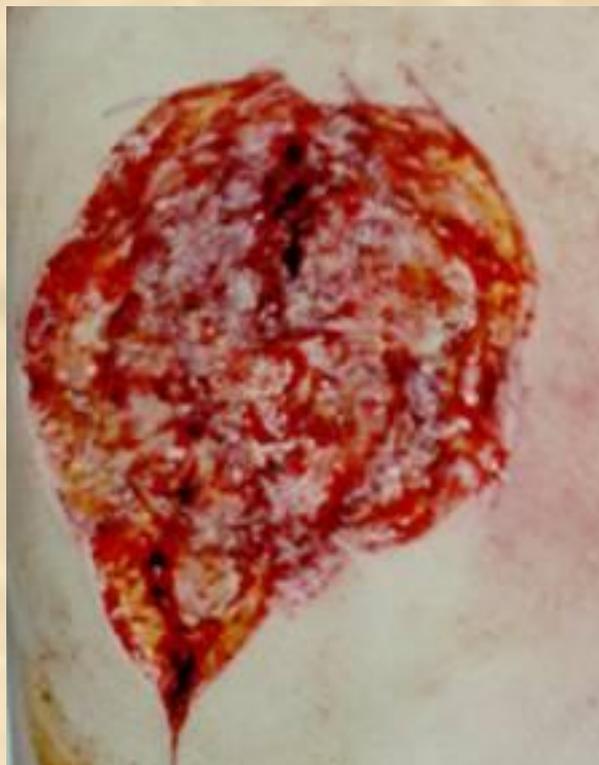
3.1. Распределение больных по группам в зависимости от лечения фармакологических форм фотодитазина

№	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-порфиринов 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.**