

И. А. Шугайлов¹, А. Р. Джанчатова¹, Н. Н. Булгакова²

НАКОПЛЕНИЕ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА "РАДАДЕНТ ПЛЮС" В ДЕСНЕ ПРИ ЕГО ИЗОЛЯЦИИ КАППОЙ

¹Кафедра стоматологии РМАПО; ²Отдел оптической спектроскопии Института общей физики им. А. М. Прохорова РАН, Москва

Поиск новых эффективных фотосенсибилизаторов, доступных для широкого применения метода фотодинамической терапии в предоперационном и послеоперационном периодах для профилактики и лечения воспалительных осложнений после удаления зубов, дентальной имплантации и ряда других оперативных вмешательств, а также воспалительных заболеваний пародонта остается актуальной проблемой современной стоматологии. В данной работе изучена кинетика накопления и распределения в слизистой оболочке десны нового изделия медицинского назначения, фотосенсибилизатора для фотодинамической терапии воспалительных заболеваний полости рта "РадаДент плюс".

Ключевые слова: антимикробная фотодинамическая терапия, фотосенсибилизатор, флуоресцентная спектроскопия, стоматология

ACCUMULATION AND DISTRIBUTION OF THE RADADENT PLUS PHOTOSENSITIZER IN THE GUM IN CASE OF ITS ISOLATION WITH A MOUTHPIECE

Shugailov I.A., Dzhanchatova A.R., Bulgakova N.N.

The search for novel photosensitizing agents needed to extend the range of applications of photodynamic therapy remains a challenging problem in modern dentistry. They are utterly necessary to prevent and treat complications during pre- and postoperative periods, after tooth extraction, in dental implantation and a variety of other surgical interventions, and in the case of inflammatory periodontal diseases. The present work was designed to study kinetics of the accumulation and distribution in the gingival tissues of the new medical product, RadaDent plus photosensitizer, designed for photodynamic therapy of inflammatory diseases of the oral cavity.

Key words: antimicrobial photodynamic therapy, photosensitizer, fluorescence spectroscopy, dentistry

Введение

Несмотря на значительный прогресс в решении проблемы противовоспалительной терапии заболеваний полости рта, достигнутый в последние десятилетия, остается актуальной разработка новых методов лечения. Существенное значение в патогенезе воспаления играет микрофлора полости рта, принимающая активное участие в развитии патологического процесса. По мнению ряда авторов, ведущую роль в развитии воспалительных заболеваний полости рта (гингивит, альвеолит, пародонтит, периимплантит) занимает резистентная облигатно-анаэробная и микроаэрофильная флора [11, 13]. В настоящее время для профилактики осложнений в раннем и отдаленном послеоперационном периодах традиционно применяются различные препараты общего и местного воздействия [15], в частности антибиотики [16, 21] и антисептики [5]. Вместе с тем выбор препаратов для антимикробной химиотерапии при этом затруднен, так как в возникновении и развитии большинства форм стоматогенной инфекции участвует не один возбудитель, а микробные ассоциации из 5—8 видов и более [7, 11]. Поэтому остается опасность развития послеоперационных осложнений [5]. Кроме того, одной из причин является резкое увеличение резистентности многих штаммов микроорганизмов к антибиотикам, наблюдаемое в последние годы. В связи с этим особый интерес представляет метод фотодинамической терапии (ФДТ), который применяется как для лечения онкологических, так и неонкологических заболеваний, в том числе и в стоматологии [12, 18].

Основу ФДТ составляет способность некоторых химических препаратов, называемых фотосенсибилизаторами (ФС), в присутствии кислорода сенсibilизировать биологические системы к воздействию светового излучения определенной длины волны [6]. В результате поглощения света молекулой ФС возникает серия фотофизических процессов, приводящих к образованию синглетного кислорода, крайне реактивного цитотоксического агента. Несмотря на то, что исследования в области ФДТ в России ведутся с 1992 г. [11], применение этого метода для лечения воспалительных заболеваний полости рта сдерживалось до настоящего времени отсутствием достаточно эффективных, нетоксичных и доступных для широкого применения ФС, а также медицинской технологии их использования. Особый интерес с этой точки зрения представляют ФС хлоринового ряда [20].

В настоящее время в России разрешение на клиническое применение при ФДТ в стоматологии имел только один препарат — гель "Фотодитазин" (ООО "Вета Гранд", Россия), активным веществом которого является хлорин еб в виде комплекса с N-метил-D-глюкамином [8]. Однако хлорин еб обладает повышенным сродством к нормальному сосудистому эндотелию, что ограничивает его возможности и перспективы для лечения воспалительных заболеваний полости рта [19]. Поэтому актуальным остается поиск новых эффективных ФС, доступных для широкого применения в стоматологии [2, 10].

В связи с этим большой интерес представляет разработка нового препарата для антимикробной ФДТ в стоматологии — геля-фотосенсибилизатора "РадаДент плюс" (ООО "РАДА-ФАРМА") [10].

Работа выполнена на кафедре стоматологии РМАПО.

При разработке новых технологий ФДТ, в том числе для стоматологического применения, ключевым моментом является изучение накопления и распределения ФС в тканях пациентов и выбор оптимального времени его экспозиции. Поскольку многие ФС обладают характерной флюоресценцией в красной области спектра, информация об их накоплении и распределении может быть получена при измерении спектров экзогенной флюоресценции тканей пациентов методом локальной флюоресцентной спектроскопии (ЛФС) [3, 14].

Целью данной работы было изучение накопления и распределения геля-фотосенсибилизатора "РадаДент плюс" в слизистой оболочке десны и оптимизация времени его экспозиции при изоляции каппой.

Материал и методы

В данной работе был использован гель-фотосенсибилизатор тканей к световому излучению "РадаДент плюс" (регистрационное удостоверение №ФСР 2010/08622, ООО "РАДА-ФАРМА"). Активным веществом "РадаДент плюс" является субстанция "радахлорин", которая содержит композицию из трех циклических тетрапирролов хлориновой природы (с гидрированным кольцом D). Основными компонентами субстанции являются хлорин натрия еб, хлорин натрия рб, пурпурин 5.

Изучение накопления ФС в слизистой оболочке десны проводили в группе, состоящей из 12 соматически здоровых добровольцев со здоровыми тканями пародонта. Гель "РадаДент плюс" наносили на нижнюю челюсть в количестве 0,1 мл/см² зубодесневой бороздки. Изоляцию фотосенсибилизатора от слюны проводили индивидуальными пластиковыми каппами, изготовленными методом вакуумной формовки. Время экспозиции ФС составляло 5, 10, 15, 30, 45, 60 мин. По окончании срока экспозиции геля каппы удаляли из полости рта и проводили очищение десны от остатков геля путем ополаскивания водой.

Интервал между нанесением геля составлял 2 сут.

Аппаратура для спектрально-флюоресцентных исследований

Для проведения ЛФС применяли компьютеризованную спектрально-флюоресцентную диагностическую установку "Спектр-Кластер" (регистрационный номер РФ №ФСР 2011/10331, ООО "Кластер", Москва). Измерения проводили *in vivo* с помощью волоконно-оптического катетера, специально разработанного для стоматологического применения. В качестве источников возбуждения использовали излучение лазерного диода с длиной волны генерации 636 нм, которое попадает в последнюю, длинноволновую полосу поглощения хлоринов. Выходная мощность возбуждающего лазерного излучения с конца катетера составляла 0,5 мВт. Спектры регистрировали в диапазоне 625—750 нм, спектральное разрешение при использовании волоконно-оптического диагностического катетера составляло менее 5 нм.

В исследовании была использована методика ЛФС, которая позволяет проводить неинвазивные и воспроизводимые измерения при возбуждении экзогенной флюоресценции биологических тканей в красной области спектра [4]. Данная методика широко используется при доклинических и клинических испытаниях новых ФС [3, 4]. Для нормирования спектров используется величина обратного диффузно-рассеянного в ткани сигнала возбуждающего лазерного излучения (ОДР) [4]. Величина нормированной флюоресценции F_n , определяемая как отношение интегральной интенсивности флюоресценции ткани в спектральном диапазоне 650—750 нм к интегральной интенсивности ОДР-сигнала в спектральном диапазоне 628—638 нм пропорциональна концентрации ФС в ткани и, следовательно, может быть использована для изучения кинетики его накопления и распределения [4].

Измерения спектров флюоресценции проводили в затемненном помещении после проведения профессиональной гигиены полости рта до и после аппликационного нанесения геля "РадаДент плюс". В качестве контрольных точек были выбраны: зубодесневой сосочек (ДС), маргинальная десна (МД), альвеолярная десна (АД). Также проводился мониторинг экзогенной флюоресценции ФС в коже лица.

Статистические расчеты производились с помощью пакета SPSS 14-й версии. Использованы описательные статистики, визуализация данных при помощи диаграмм и таблиц. Для отображения разброса значений и других характеристик переменных использованы коробчатые диаграммы [1]. Для оценки различий был использован непараметрический статистический тест — метод Манна—Уитни, предназначенный для сравнения независимых выборок [9]. Различия признавались значимыми при уровне $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Согласно данным ЛФС, при возбуждении в красной области спектра интенсивность эндогенной (аутофлюоресценции) слизистой оболочки десны, измеряемой до нанесения геля-фотосенсибилизатора, была ничтожно мала у всех пациентов. Величина нормированной флюоресценции F_n составляла $1,0 \pm 0,3$ отн. ед. После нанесения геля при всех временах его экспозиции у всех пациентов во всех контрольных точках регистрировалась широкая полоса излучения с максимумом на длине волны 670 нм, идентичная спектру экзогенной флюоресценции ФС на основе хлоринов [17].

На рис. 1, 2 на вклейке представлены типичные спектры лазериндуцированной флюоресценции, измеренные в контрольных точках верхней (ВЧ) и нижней (НЧ) челюсти одного пациента через 5 и 45 мин экспозиции.

Можно видеть, что незначительная по интенсивности экзогенная флюоресценция ФС регистрировалась в контрольных точках ВЧ и НЧ уже при минимальном времени экспозиции (см. рис. 1). Значения нормированной флюоресценции в спектрах контрольных точек составляли: в ДС ВЧ $F_n = 3,7$ отн. ед.; в МД ВЧ $F_n = 4,8$ отн. ед.; в АД ВЧ $F_n = 2,3$ отн. ед.; в ДС НЧ $F_n = 2,2$ отн. ед.; в МД НЧ $F_n = 5,4$ отн. ед.; в АД НЧ $F_n = 3,8$ отн. ед. Таким образом, экзогенная флюоресценция ФС регистрировалась не только в контрольных точках НЧ, на которую он был нанесен, но и в контрольных точках ВЧ, куда препарат не наносили. Следует предположить, что уже при 5 мин экспозиции происходит диффузия ФС в общий кровоток и его распределение в слизистой оболочке десны ВЧ и НЧ.

При времени экспозиции геля 45 мин (см. рис. 2) в контрольных точках обеих челюстей регистрировалась значительно более интенсивная экзогенная флюоресценция ФС. Величина нормированной флюоресценции намного превышала соответствующие величины, измеренные в контрольных точках после 5 мин экспозиции, и составляла: в ДС ВЧ $F_n = 7,8$ отн. ед.; МД ВЧ $F_n = 3,8$ отн. ед.; АД ВЧ $F_n = 3$ отн. ед.; ДС НЧ $F_n = 12,1$ отн. ед.; МД НЧ $F_n = 7,2$ отн. ед.; АД НЧ $F_n = 5,7$ отн. ед. Наиболее интенсивная экзогенная флюоресценция и соответственно наибольшее накопление ФС регистрировалось в слизистой оболочке ДС как ВЧ, так и НЧ. При этом в ДС НЧ накопление ФС было в 1,6 раза выше, чем в ДС ВЧ.

На рис. 3—5 представлены зависимости величины экзогенной флюоресценции F_n от времени экспозиции

препарата "РадаДент плюс" в каждой контрольной точке ВЧ и НЧ, полученные для всей группы пациентов.

Как видно из рис. 3, при экспозиции 5 и 10 мин накопление ФС в слизистой оболочке ДС нижней челюсти минимально: средние значения F_n варьируются в диапазоне от 7 до 9 отн. ед. При увеличении времени экспозиции величина F_n достоверно возрастает ($p < 0,05$), ее средние значения варьируются в диапазоне 21—33 отн. ед. Как следует из представленных зависимостей, в контрольной точке ДС НЧ наблюдается тенденция к максимальному накоплению фотосенсибилизатора при экспозиции 45 мин, при которой величина F_n достигает максимальных средних значений. В контрольной точке ДС ВЧ средние значения F_n достоверно ниже, чем в ДС НЧ при всех сроках экспозиции и незначительно варьируются в диапазоне от 3 до 6 отн. ед. Достоверных различий в величине F_n в интервале изученных экспозиций ФС не выявлено ($p > 0,05$).

На рис. 4 представлены зависимости величины нормированной флюоресценции F_n от времени экспозиции геля-фотосенсибилизатора в контрольной точке МД. Можно видеть, что в НЧ накопление ФС минимально при экспозиции 5 и 10 мин: средние значения величины F_n составляют 6—8 отн. ед. При экспозиции 15, 30, 45 и 60 мин величина F_n достоверно возрастает ($p < 0,05$), ее средние значения варьируются в диапазоне от 13 до 24 отн. ед. В МД НЧ также наблюдается тенденция к максимальному накоплению ФС при экспозиции 45 мин, при которой величина F_n достигает максимальных средних значений. В ВЧ при всех сроках экспозиции средние значения величины F_n достоверно ниже, чем в МД НЧ, и варьируются незначительно в диапазоне 3—5 отн. ед., при этом достоверных различий в интервале изученных экспозиций ФС не выявлено ($p > 0,05$).

На рис. 5 представлены зависимости экзогенной флюоресценции F_n от времени экспозиции геля-фотосенсибилизатора в контрольной точке АД. Как видно из данного рисунка, накопление ФС минимально при экспозиции 5, 10 и 15 мин, средние значения F_n составляют 9—10 отн. ед. При экспозиции 30, 45 и 60 мин величина F_n достоверно возрастает ($p < 0,05$), средние значения F_n варьируются в диапазоне от 13 до 21 отн. ед. В данной контрольной точке также прослеживается тенденция к максимальному накоплению фотосенсибилизатора при экспозиции 45 мин. Что касается ВЧ, средние значения F_n при всех сроках экспозиции достоверно ниже, чем в НЧ и варьируются незначительно в диапазоне от 3 до 5 отн. ед., при этом достоверных различий в интервале исследованных экспозиций не выявлено ($p > 0,05$).

Как следует из представленных диаграмм, во всех контрольных точках десны НЧ наблюдается большой разброс значений нормированной флюоресценции F_n , свидетельствующий о неравномерном распределении ФС в тканях. Из возможных причин можно указать аппликационное нанесение геля, неплотный контакт с поверхностью слизистой оболочки при его изоляции каппой.

Полученные результаты показывают повышенное накопление ФС в области ДС. Это может быть связано с повышенной травматичностью данного участка и наличием в нем элементов хронического воспаления. Известно, что очаги воспаления наряду с тканями

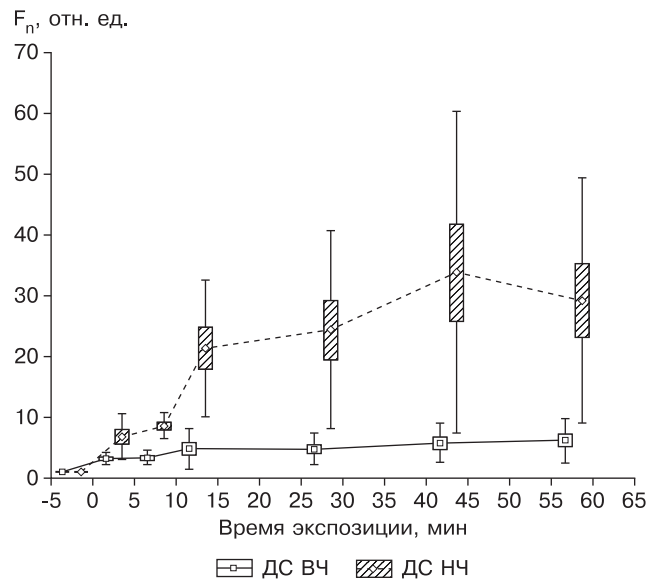


Рис. 3. Зависимость величины экзогенной флюоресценции F_n в контрольной точке ДС от времени экспозиции геля-фотосенсибилизатора при его изоляции на НЧ.

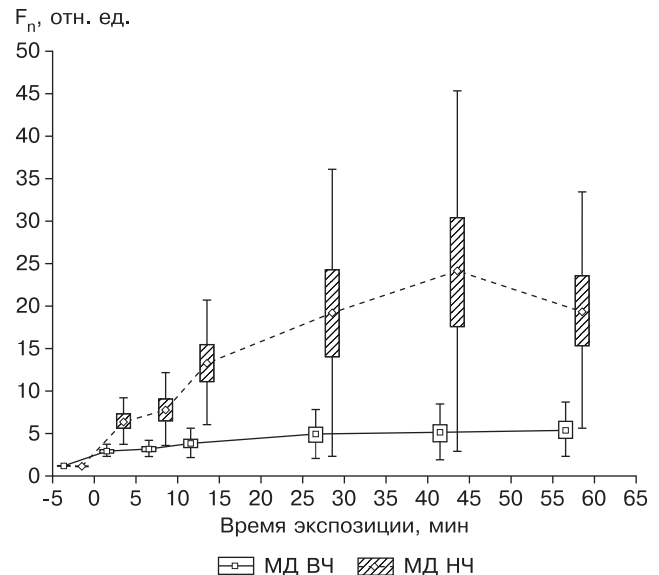


Рис. 4. Зависимость величины экзогенной флюоресценции F_n в контрольной точке МД от времени экспозиции геля-фотосенсибилизатора при его изоляции на НЧ.

злокачественных новообразований обладают свойством к большему накоплению ФС, чем окружающие здоровые ткани [12, 18].

С целью выявления кумулятивного эффекта накопления ФС после его многократного нанесения ЛФС проводилась перед вторым и каждым последующим нанесением геля у всех пациентов данной группы. Измерения спектров показали, что при всех временах экспозиции экзогенная флюоресценция ФС в контрольных точках слизистой оболочки десны через 2 сут после нанесения геля не регистрируется. Это позволяет сделать вывод о быстром выведении ФС из слизистой оболочки полости рта и отсутствии кумулятивного эффекта его накопления при многократном аппликационном нанесении.

Следует также отметить, что ни у одного из пациентов данной группы в коже лица экзогенная флюо-

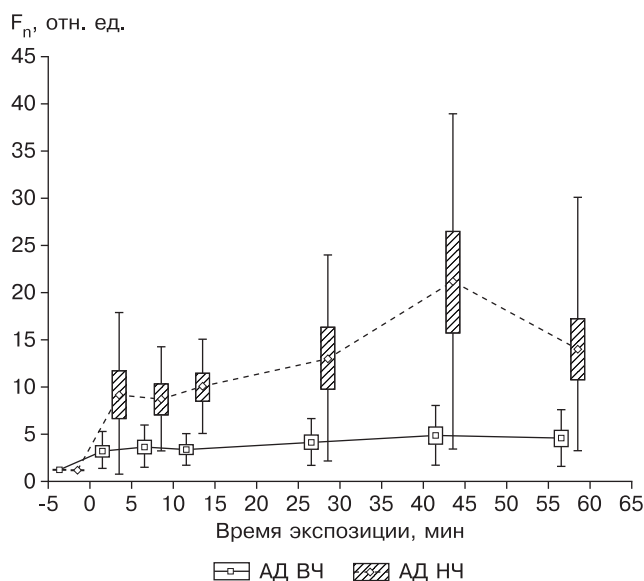


Рис. 5. Зависимость величины экзогенной флюоресценции F_n в контрольной точке АД от времени экспозиции геля-фотосенсибилизатора при его изоляции на НЧ.

ресценция ФС не детектировалась. Это согласуется с отсутствием фототоксических реакций кожных покровов (покраснение, гиперемия), которые обычно наблюдаются при системном введении ФС [12].

Выводы

1. При нанесении препарата "РадаДент плюс" и его изоляции капкой на НЧ при временах экспозиции от 5 до 60 мин экзогенная флюоресценция ФС регистрировалась во всех контрольных точках ВЧ и НЧ. Это свидетельствует о его диффузии через капиллярную сеть в общий кровоток и распределении в слизистой оболочке всей полости рта.
2. Минимальное накопление ФС в слизистой оболочке десны регистрировалось при экспозиции 5 и 10 мин. При времени экспозиции 15 мин экзогенная флюоресценция ФС достоверно возросла ($p < 0,05$) во всех контрольных точках НЧ, что свидетельствовало о его большем накоплении.
3. При дальнейшем увеличении времени экспозиции до 30, 45 и 60 мин наблюдалась тенденция к увеличению накопления ФС во всех контрольных точках НЧ, при этом максимальные средние значения экзогенной флюоресценции регистрировались при экспозиции 45 мин. Полученные результаты позволяют предположить, что данное время экспозиции является оптимальным для проведения ФДТ.
4. Распределение ФС в слизистой оболочке десны НЧ было неоднородным. При времени экспозиции от 15 до 60 мин наибольшая экзогенная флюоресценция и соответственно наибольшее накопление ФС регистрировались в слизистой оболочке ДС НЧ. Это, вероятно, связано с анатомической особенностью данного участка, его повышенной травматичностью и как следствие наличием элементов хронического воспаления.
5. При времени экспозиции 15, 30, 45 и 60 мин накопление ФС в контрольных точках ВЧ было мень-

ше, чем в соответствующих контрольных точках НЧ (величина F_n достоверно ниже, $p < 0,05$).

6. Независимо от времени экспозиции препарата "РадаДент плюс" через 2 сут после его аппликации экзогенная флюоресценция ФС в слизистой оболочке полости рта не регистрировалась, что свидетельствовало о его полном выведении.
7. Независимо от времени экспозиции препарата "РадаДент плюс" экзогенная флюоресценция ФС в коже лица у пациентов не регистрировалась. Это подтверждается отсутствием кожных фототоксических реакций у всех лиц, участвующих в данном исследовании, и позволяет сделать вывод о том, что при аппликационном нанесении препарата "РадаДент плюс" в полости рта не требуется соблюдения особого светового режима.

ЛИТЕРАТУРА

1. Боровиков В. П. Методология и технологии современного анализа данных. — 2008.
2. Булгакова Н. Н., Ягудаев Д. М., Сорокатый А. Е. и др. // Физ. мед. — 2005. — Т. 15, № 2. — С. 15—21.
3. Булгакова Н. Н., Соколов В. В., Чиссов В. И., Смирнов В. В. // Альманах клинической медицины. — 2006. — Т. 12. — С. 10.
4. Жаркова Н. Н. Спектрально-флуоресцентные исследования фотосенсибилизаторов в онкологической диагностике: Автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук. — М., 1991.
5. Иванов Д. Ю. Магнитопунктура в профилактике и воспалительном лечении осложнений после ретракции зубов и дентальной имплантации: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 2009.
6. Красновский А. А. // Биофизика. — 2004. — Т. 9, вып. 2. — С. 305—321.
7. Очиров Е. А. Профилактика воспалительных осложнений дентальной имплантации с применением хлоргексидинсодержащих препаратов: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Екатеринбург, 2010.
8. Пономарев Г. В., Тауровский Л. Д., Зарецкий А. М. и др. Фотосенсибилизатор и способ его получения. Пат. № RU 2276976 С2. Патентообладатель ОАО "Группа компаний "ГРАНД" от 10.08.2004.
9. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. — М., 2003. — С. 109—111.
10. Решетников А. В., Залевский И. Д., Кемов Ю. В. и др. Фотосенсибилизатор и способ его получения. Пат. РФ № 2183956 С2. Патентообладатель ООО "РАДА-ФАРМА". Положительное решение от 21 дек. 2001 г. По заявке от 30 марта 2001 г.
11. Рисованная О. Н. Экспериментально-клиническое обоснование применения бактериотоксической светотерапии воспалительных заболеваний тканей пародонта: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 2005.
12. Соколов В. В., Якубовская Р. И., Лукьянец Е. А. // Хирург. — 2008. — № 5. — С. 15—21.
13. Янушевич О. О., Ушаков Р. В., Царев В. Н. Антимикробная терапия и профилактика воспалительных осложнений заболеваний пародонта: Учеб. пособие. — М., 2009. — С. 3, 16—22.
14. Bulgakova N. N., Kazachkina N. I., Sokolov V. V. et al. // Laser Physics. — 2006. — Vol. 16, N 5. — P. 889—895.
15. Crauford J. Y. // Drysocket/DentCosmos. — 1986. — P. 38—42.
16. Fazakerley M. W., McGowan P., Hardy P., Martin V. // Br. Dent. J. — 1993. — Vol. 174. — P. 359—363.
17. Ivanov A. V., Reshetnikov A. V., Ponomarev G. V. // Proc. SPIE. — 2000. — Vol. 3909. — P. 124—130.
18. Konopka K., Goslinski T. // J. Dent. Res. — 2007. — Vol. 86, N 11. — P. 1126.
19. Pat. 5,308,861 (05/1994) USA / Aizawa K., Kuroiwa Y. // Chem. Abstr. — 1993. — Vol. 118. — N 161058v.
20. Profio A. E., Doiron D. R. // Photochem. and Photobiol. — 1987. — Vol. 46. — P. 591—599.
21. Sorensen D. S., Preisch J. W. // Oral Surg. — 1997. — Vol. 82. — P. 123—128.
22. Soukos N. S., Hamblin M. R., Hasan T. // Photochem. and Photobiol. — 1997. — Vol. 65. — P. 723—729.

Поступила 15.09.11