

Эффективность фотодинамической терапии в лечении венозных трофических язв в эксперименте

Б.В. Болдин¹, П.Ю. Туркин^{1✉}, pavelturkin@gmail.com, А.П. Эттингер¹, В.Ю. Богачев¹, Н.О. Сомов¹, С.Г. Кузьмин^{2,3}, В.Б. Лощенов⁴, Л.М. Михалева⁵, К.Ю. Мидибер^{5,6,7}

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова; 117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1

² Международный научный и клинический центр «Интермедбиофизхим»; 103752, Россия, Москва, Нижний Кисельный пер., д. 5/23, стр. 1

³ Научно-исследовательский институт органических полупродуктов и красителей; 141701, Россия, Московская обл., Долгопрудный, Лихачевский проезд, д. 7

⁴ Институт общей физики имени А.М. Прохорова Российской академии наук; 119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, д. 38

⁵ Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына Российского научного центра хирургии имени академика Б.В. Петровского; 117418, Россия, Москва, ул. Цюрупы, д. 3;

⁶ Городская клиническая больница №31 Департамента здравоохранения г. Москвы; 119415, Россия, Москва, ул. Лобачевского, д. 42, стр. 1

⁷ Российский университет дружбы народов; 117198, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

Резюме

Введение. В настоящее время отмечается возрастание интереса к возможностям применения фотодинамической терапии (ФДТ) в лечении венозных трофических язв (ВТЯ). Сегодня все большую популярность набирает антимикробная фотодинамическая терапия (а-ФДТ), которая отличается выраженной бактерицидной активностью и противовоспалительным действием. Вместе с тем до настоящего времени не проводилось исследований на животной модели, посвященных морфологическим изменениям в клетках после воздействия ФДТ на ВТЯ при использовании ФС разных типов. Остаются нерешенными вопросы сравнения патоморфологических изменений в тканях при сравнении а-ФДТ с обычной ФДТ. Остается недоказанной эффективность данного метода лечения на клеточном уровне.

Цель. Оценить эффективность ФДТ и а-ФДТ в комплексном лечении трофических язв в эксперименте *in vivo* и сравнить их со стандартной методикой лечения ВТЯ.

Материалы и методы. Проведена серия экспериментов на 21 кролике, разделенных на три равные группы по семь голов в каждой. ВТЯ была смоделирована у всех кроликов. Контрольной группе проводилась стандартная терапия ВТЯ. В группе ФДТ проводилась ФДТ с использованием «Фотосенса». В группе а-ФДТ производилась а-ФДТ с использованием «Холосенса». Площадь раневой поверхности определяли на 1, 5, 9, 15 и 21-е сут. Бактериологическое исследование проводили до лечения, на 5-е и 9-е сут. Морфологическое исследование язвы проводили на 1, 9 и 15-е сут.

Результаты. Группа а-ФДТ, 15-й день: эпителизация раны 100%. Контрольная группа, 21-е сут.: объем ран уменьшился в среднем на 50%. Группа ФДТ: эпителизация раны 100%. Морфологическое исследование выявило положительную динамику в группе а-ФДТ по сравнению с ФДТ и контрольными группами, что выразилось в уменьшении общей массы некротического детрита, изменении количественного и качественного состава воспалительного инфильтрата.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о том, что использование а-ФДТ рекомендуется при лечении ВЛУ. Как ФДТ, так и а-ФДТ показала лучшие результаты по сравнению со стандартной терапией.

Ключевые слова: трофические язвы, венозные язвы, эксперимент, животная модель, эксперимент *in vivo*, хроническая венозная недостаточность, длительно незаживающие раны

Для цитирования: Болдин Б.В., Туркин П.Ю., Эттингер А.П., Богачев В.Ю., Сомов Н.О., Кузьмин С.Г., Лощенов В.Б., Михалева Л.М., Мидибер К.Ю. Эффективность фотодинамической терапии в лечении венозных трофических язв в эксперименте. *Амбулаторная хирургия*. 2022;19(2):82–94. <https://doi.org/10.21518/1995-1477-2022-19-2-82-94>.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Efficacy of photodynamic therapy in the treatment of venous trophic ulcers: results from the experiment

Boris V. Boldin¹, Pavel Yu. Turkin^{1✉}, pavelturkin@gmail.com, Alexander P. Oettinger¹, Vadim Yu. Bogachev¹, Nikita O. Somov¹, Sergey G. Kuzmin^{2,3}, Viktor B. Loschenov⁴, Liudmila M. Mikhaleva⁵, Konstantin Yu. Midiber^{5,6,7}

¹ Pirogov Russian National Research Medical University; 1, Ostrovityanov St, Moscow, 117997, Russia

² International Research and Clinical Center 'Intermedbiophiskhim'; Bldg. 1, 5/23, Nizhniy Kiselnii Per., Moscow, 103752, Russia

³ Research Institute of Organic Intermediates and Dyes; 7, Likhachevskiy Proezd, Dolgoprudnyi, Russia, Moscow Region, 123995, Russia

⁴ Prokhorov General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences; 38, Vavilov St., Moscow, 119991, Russia

⁵ Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Petrovsky National Research Centre of Surgery; 3, Tsyurupa St., Moscow, 117418, Russia

⁶ City Clinical Hospital No. 31; Bldg. 1, 42, Lobachevskogo St., Moscow, 119415, Russia

⁷ Peoples' Friendship University of Russia; 6, Miklukho-Maklai St., Moscow, 117198, Russia

Abstract

Introduction. Today, antimicrobial photodynamic therapy (a-PDT) becomes more and more popular, because of it pronounced bactericidal activity, anti-inflammatory effect. At the same time, no animal model studies have been conducted on morphological changes in cells after exposure to PDT on venous ulcers (VU) when using different types of photosensitizers (PS). The problem of comparing morphological changes in tissues when using a-PDT vs conventional PDT have not yet been resolved.

Aim. Evaluation of the effectiveness of PDT and APDT in a comprehensive examination of trophic ulcers in an in vivo experiment and compare them with standard methods for the treatment of VLU.

Materials and methods. A series of experiments was conducted on 21 rabbits, separated into 3 equal groups of 7 rabbits each. Venous trophic ulcer was originally modeled for all rabbits. To obtain a VU, we performed an additional ligation of v. femoralis. The control group received standard therapy for VU. The PDT group had PDT with Photosens. The a-PDT group underwent a-PDT using Cholosens. Every 3 days, picture of local inflammation, regeneration rate and ulcer volume were determined. A morphological study of VLU was carried out on the first, 9th and 15th days.

Results. The a-PDT group day 15: 100% wound epithelization. Control group day 21st: The volume of wounds decreased on average by 50%. The PDT group: 100% wound epithelization. The morphological study indicated a positive trend in the a-PDT group compared with PDT and control groups, which resulted in a decrease in the total mass of necrotic detritus, a change in the quantitative and qualitative composition of inflammatory infiltrate.

Conclusion. The data obtained indicate that the use of a-PDT is recommended in treatment of VLU. Both PDT and a-PDT methods showed better results in comparison with standard therapy.

Keywords: trophic ulcers, venous ulcers, experiment, animal model, in vivo experiment, chronic venous insufficiency, long-term non-healing wounds

For citation: Boldin B.V., Turkin P.Yu., Oettinger A.P., Bogachev V.Yu., Somov N.O., Kuzmin S.G., Loschenov V.B., Mikhaleva L.M., Midiber K.Yu. Efficacy of photodynamic therapy in the treatment of venous trophic ulcers: results from the experiment. *Ambulatornaya Khirurgiya*. 2022;19(2):82–94. (In Russ.) <https://doi.org/10.21518/1995-1477-2022-19-2-82-94>.

Conflict of interests: the authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Венозные трофические язвы (ВТЯ) представляют собой открытые поражения кожи, локализованные в нижней и среди трети голени, возникшие вследствие патологии вен нижних конечностей. Они являются наиболее часто встречающимся типом трофических язв на голенях, на их долю приходится около 60–80% от общего числа язв. Распространенность венозных трофических язв составляет от 0,18 до 1% [1]. В возрасте старше 65 лет она увеличивается до 4% [2–4].

По данным ряда авторов, после проведенного консервативного лечения наблюдается высокий уровень рецидивирования ВТЯ от 15 до 45% случаев, что приводит к увеличению продолжительности лечения пациентов в стационаре [5, 6]. Кроме того, ВТЯ приводят к стойкой инвалидизации от 10 до 67% пациентов [7].

По всей видимости, неудачи в лечении ВТЯ могут быть обусловлены резистентностью микроорганизмов к применяемым антибактериальным средствам, формированием биопленок, затрудняющих проникновение лекарственных средств в раны, низкими возможностями репаративной активности местных тканей [8].

Применение существующих методов пока не позволяет добиться оптимального результата, в связи чем остается актуальным поиск альтернативных методик лечения.

В настоящее время отмечается рост интереса к возможностям использования фотодинамической терапии (ФДТ) как способа лечения, основанного на применении фотосенсибилизаторов (ФС) в комплексе с низкоинтенсивным лазерным излучением, длина волны которого соответствует пику поглощения ФС [9].

ФДТ оказывает спазмолитический, обезболивающий, противовоспалительный и биостимулирующий эффекты [9, 10]. Также преимуществом ФДТ при лечении пациентов с ВТЯ является ее неинвазивность, восстановление эластичности клеточных мембран, нормализация лимфо- и гемо микроциркуляции в зоне воздействия [11]. ФДТ обладает способностью восстанавливать регулирующие и саногенетические функции тканей за счет активации ферментных систем [12, 13].

Фотодинамическая терапия доказала свою эффективность в различных областях медицины, найдя широкое применение в онкологии, гинекологии, стоматологии и других областях [13].

Одной из разновидностей ФДТ является антибактериальная ФДТ (а-ФДТ), которая предполагает более активную пенетрацию ФС в бактериальную клетку за счет его хелатной формы, вследствие чего достигается более значимый антибактериальный эффект [14].

На фоне ускоренного образования антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов возрастает актуальность антимикробной фотодинамической терапии. а-ФДТ обладает выраженной бактерицидной активностью и противовоспалительным действием. В отличие от обычной ФДТ а-ФДТ способствует активации иммунного ответа, а также предупреждает дистрофические и склеротические процессы [15]. Октакатионный фталоцианин цинка («Холосенс») под действием света образует цитотоксический синглетный кислород, инициирующий окислительную деструкцию патогенных микроорганизмов и гибель вирусов, грибов и бактерий, включая их антибиотикорезистентные штаммы. Кроме того, в сравнении с антибиотикотерапией, противомикробное действие ФДТ не приводит к развитию резистентности микроорганизмов к лечению [16].

До настоящего момента не сообщалось об экспериментальных исследованиях на животной модели по оценке эффективности фотодинамической терапии и антибактериальной фотодинамической терапии в лечении ВТЯ. Отсутствие литературных данных не позволяет полноценно оценить влияние ФДТ и а-ФДТ на морфологические изменения в тканях в области трофической язвы, объективно описать сравнительную эффективность данных методик. Вышеописанные факторы определили научную новизну данного исследования и обусловили формулировку его основных целей, а именно определение патоморфологических изменений в тканях с моделированием трофической язвы как обоснование применения методов ФДТ с использованием разных типов ФС для лечения ВТЯ. Подобное исследование создаст основу и определит перспективы использования ФДТ и а-ФДТ в лечении ВТЯ в клинике.

Цель – оценить эффективность ФДТ и а-ФДТ в комплексном лечении трофических язв в эксперименте *in vivo* и сравнить их со стандартными методиками лечения ВТЯ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальное исследование было проведено в отделе экспериментальной хирургии НИИ клинической хирургии РНИМУ Н.И. Пирогова. Экспериментальными животными явились 21 кролик вида советская шиншилла в возрасте 6 мес. обоего пола с массой тела

от 1,5 до 2,0 кг. Животных содержали в индивидуальных клетках на стандартном рационе вивария со свободным доступом к воде и пище.

Проведение эксперимента, а также выведение животных из эксперимента проведены в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных, разрешение локального этического комитета РНИМУ им. Пирогова (протокол №62 от 13.11.2019 г.).

В данном экспериментальном исследовании произведена оценка и сравнение эффективности применения ФДТ в местном лечении венозных язв.

Исследование состояло из двух этапов. На первом этапе – создание модели трофической язвы венозной этиологии у кроликов, на втором – разделение кроликов на три группы с дальнейшим облучением ФДТ и динамическими обследованиями.

Всем кроликам трех групп изначально моделировали трофические язвы по единой оригинальной методике [17], которую производили под внутривенным наркозом с использованием препарата Золетил 100 – 15 мг/кг в/м, после чего производили доступ к бедренной вене с левой стороны с последующим ее прошиванием через центр сосуда нерассасывающимся атравматическим шовным материалом Prolen 7/0 и перевязкой 1/2 вены (рис. 1).

Далее выполняли иссечение кожи по задненаружной поверхности нижней трети бедра до поверхностной фасции в виде круга диаметром 40 мм с последующим рассечением поверхностной фасции поперечными и продольными, взаимно перпендикулярными разрезами. Далее сформированную язву стягивали кистетным швом, доводя рану в диаметре до 20 мм. Накладывали асептическую повязку (рис. 2).

После формирования трофической язвы по описанной методике кролики были разделены на три сопоставимые группы, по семь животных в каждой.

В контрольной группе была применена местная терапия, включающая в себя ежедневные перевязки с обработкой трофической язвы стерильным подогретым физиологическим раствором без использования ФДТ.

В группе ФДТ на фоне аналогичной местной терапии была проведена процедура фотодинамической терапии с использованием фотосенсибилизатора гидроксид алюминия трисульфоталоцианина («Фотосенс»).

В группе АФДТ на фоне аналогичной местной терапии была проведена процедура фотодинамической терапии с использованием октакатионного фталоцианина цинка («Холосенс»).

Процедуру ФДТ у кроликов проводили следующим образом:

РИСУНОК 1. Перевязка ½ бедренной вены
FIGURE 1. Ligation of ½ femoral vein

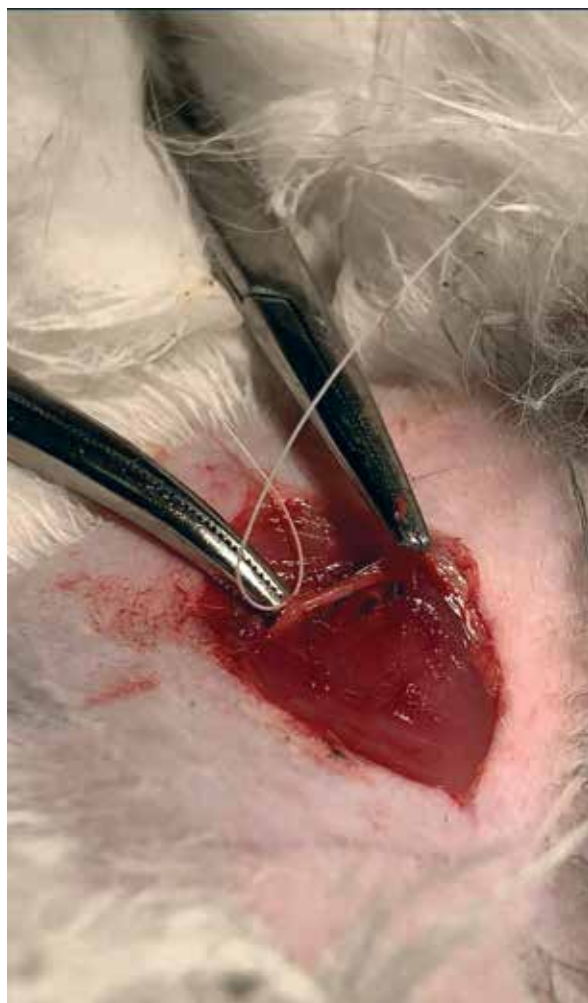


РИСУНОК 2. Сформированная модель венозной трофической язвы
FIGURE 2. Formed model of venous trophic ulcer



1. В группе ФДТ за сутки до проведения облучения на искусственно созданную трофическую язву производили аппликацию раствора ФС гидроксид алюминия трисульфоталлоцианина («Фотосенс») с экспозицией на 24 ч с концентрацией действующего вещества 5 мкг/мл (с расчетом 0,5 мкг/см²) с предварительным разведением 0,9% раствором натрия хлорида 1:4 за 1–24 ч до проведения ФДТ.

В группе АФДТ на рану накладывали марлевую салфетку с октакатионным фталоцианином цинка («Холосенс») с концентрацией действующего вещества 8 мкг/мл (с расчетом 0,6 мкг/см²). Через 10 мин салфетка удалялась и рана подвергалась фотодинамическому воздействию.

2. Проведение ФДТ венозных трофических язв кроликам групп ФДТ и АФДТ осуществлялось с помощью лазера «ЛФТ-02-Биоспек» (ИОФ РАН, «БИОСПЕК») (рис. 3).

В группе АФДТ были использованы следующие характеристики лазерного облучения: время сеанса 15 мин, мощность 80 Вт, длина волны 630 нм.

При проведении ФДТ у кроликов группы АФДТ характеристики лазерного облучения были такими же, как и у группы ФДТ, за исключением мощности, которая при использовании октакатионного фталоцианина цинка составляла 50 Вт [18].

3. По окончании сеанса фотодинамической терапии кроликам обеих групп (ФДТ и АФДТ) на область трофической язвы накладывали асептическую повязку. Далее производили эластическое бинтование конечности. В контрольной группе наложение асептической повязки и бинтование не сопровождалось ФДТ.

РИСУНОК 3. Процесс облучения трофической язвы
FIGURE 3. Process of irradiation of a trophic ulcer



Для оценки динамики уменьшения площади ВТЯ применяли планиметрическое исследование. Определяли площадь раневой поверхности на 1, 5, 9, 15 и 21-е сут.

Определение площади язвенного дефекта проводилось следующим образом: на трофическую язву накладывали стерильные миллиметровые прозрачные листы, на которые маркером переносили контур язвенного дефекта. Измерения общей площади, окружности, максимальной длины и перпендикулярной к ней максимальной ширины язвы были сделаны с использованием приложения LesionMeter¹ (рис. 4).

Определение скорости эпителизации трофических язв в динамике производилось по формуле Л.Н. Поповой², где S – площадь дефекта при предыдущем измерении, S_n – площадь дефекта при последующем измерении, t – время между измерениями.

¹ LesionMeter. Медицинское приложение, которое измеряет площадь кожных очагов, новообразований или язв любой формы без дополнительных инструментов. Режим доступа: <http://lesion.phlebounion.ru>.

² Попова Л.Н. Как изменяются границы образующегося эпидермиса при заживлении ран: дисс., ... к-та мед. наук. Воронеж; 2006. 14 с.

РИСУНОК 4. Определение площади язвенного дефекта
FIGURE 4. Determination of the area of the ulcerous defect



Бактериологическое исследование проводили до лечения, на 5-е и 9-е сут. При проведении качественного анализа микрофлоры, находящейся на поверхности язвенных дефектов, взятие материала производили тампоном во время очередной перевязки и доставляли его в бактериологическую лабораторию с целью выделения и идентификации микроорганизмов. Выполняли окраску нативного мазка по Граму и посев исследуемого материала на жидкие и плотные питательные среды. Бактериологическое исследование проводилось в ГБУЗ г. Москвы «Диагностический центр (Центр лабораторных исследований) Департамента здравоохранения города Москвы».

На 1, 9 и 15-е сут. было проведено патоморфологическое исследование язвенных дефектов с использованием окраски гематоксилином и эозином. Биопсийный материал получали путем иссечения краевого фрагмента трофической язвы и ее дна в пределах здоровой ткани (диаметром 8 мм), которое производили на всю толщину до фасции. Морфометрический анализ производили при помощи световой микроскопии, оценку проводили при увеличении $\times 40$ в десяти полях зрения. Морфометрические показатели включали характеристику клеточного состава. С помощью программного обеспечения ImageScope Color M проводили подсчет клеточного состава воспалительного инфильтрата, определение отека по межклеточному расстоянию, отмечали морфологические признаки регенераторных процессов в зависимости от метода лечения.

Материал анализировали в автоматическом гистопроцессоре Leica ASP 30 после фиксации в 10% формалине, 95% этиловом спирте, ксилоле и горячем парафине. После заливки материала в парафине в станции Leica EG 1150 были подготовлены гистосрезы толщиной 4 мкм с последующей их окраской гематоксилином и эозином в автоматической станции Leica ST 5010 и CV 5030. Исследование проводилось в НИИ морфологии человека РАМН.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика клинической картины и планиметрические исследования

С 1-х по 8-е сут. существенных различий в клинической картине течения раневого процесса у кроликов всех трех групп не отмечали. Наблюдали постепенное формирование трофической язвы с умеренной перифокальной реакцией: края раны незначительно отечны, отмечалась их гиперемия с ранней краевой эпителизацией раны.

На 9-е сут. в контрольной группе также наблюдалась умеренная перифокальная реакция. При этом площадь

раны уменьшилась в среднем на 21,4% от исходного ($p < 0,005$). В группе ФДТ на фоне проводимого лечения ВТЯ с использованием метода ФДТ с ФС «Фотосенс» отмечалась слабая перифокальная реакция: отека прилежащих тканей не наблюдалось, а площадь раны уменьшилась в среднем на 55% ($p < 0,005$). В то же время в группе АФДТ вокруг язвенного дефекта отека также не было, а площадь раны уменьшилась в среднем на 60,7% ($p < 0,005$). Дно раны было выполнено яркой грануляционной тканью. Отмечалась гиперемия краев сформированной ВТЯ с регионарной эпителизацией раны.

На 15-е сут. в контрольной группе наблюдалась умеренная перифокальная реакция, а площадь раны уменьшилась в среднем на 36% от исходной. ($p < 0,005$). В группе ФДТ на фоне проводимого лечения ВТЯ с использованием метода ФДТ с ФС «Фотосенс» на 15-е сут. перифокальная реакция отсутствовала: отека прилежащих тканей не наблюдалось, а площадь раны уменьшилась в среднем на 74% ($p < 0,005$). В то же время в группе АФДТ трофические язвы зажили у всех кроликов.

К 21-м сут. в контрольной группе площадь язв уменьшилась на 50%, кроме того, существенно уменьшилась гиперемия, отека вокруг язв не наблюдалось. При этом в группе ФДТ раневая эпителизация достигла 100% ($p < 0,05$) и образовался нормотрофический рубец, гиперемии и отека вокруг язвы не определялось (рис. 5).

Скорости эпителизации трофических язв также различались у кроликов трех групп. В контрольной группе скорость эпителизации венозных язв составила $50 \pm 1,08$ мм²/сут (2,6% за сутки), в то время как у кроликов группы ФДТ – от $105 \pm 3,30$ мм²/сут (5,72% за сутки), а у группы АФДТ – $143 \pm 4,70$ мм²/сут (7,5% за сутки). Установлено, что у кроликов группы АФДТ скорость заживления трофических язв была достоверно выше, чем у кроликов группы ФДТ и контрольной групп ($p < 0,05$) (табл.).

РИСУНОК 5. Макроскопическая оценка заживления в группе антибактериальной фотодинамической терапии
FIGURE 5. Macroscopic assessment of healing in the antibacterial photodynamic therapy group



Вышесказанное позволяет сделать вывод, что использование ФДТ и АФДТ достоверно ускоряет процессы заживления ВТЯ. По всей видимости, это связано с непосредственным бактерицидным действием фотодинамической терапии, которое приводит к усилению репаративных процессов, что более выражено в группе АФДТ. Кроме того, исследование показало, что изменения при ФДТ и АФДТ происходят не только в области непосредственно ВТЯ, но и в окружающих язву тканях.

Результаты бактериологического исследования

До лечения исходный микробный пейзаж не различался у кроликов всех трех групп, а микробная обсемененность ран составляла 10^8 – 10^9 КОЕ/г, достоверного различия между группами кроликов не выявлено. Следует отметить, что до лечения у всех 21 кроликов со сформированными ВТЯ высевалась вирулентная микрофлора, представленная *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* и др.

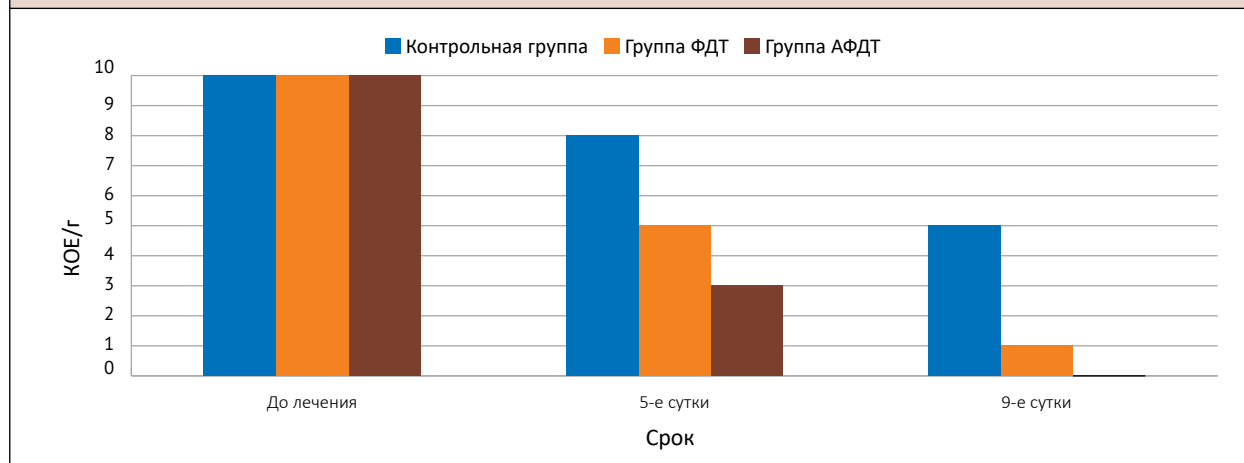
ТАБЛИЦА. Динамика изменения площади трофических язв (в мм²) в трех экспериментальных группах
TABLE. Dynamics of change in the area of trophic ulcers (in mm²) in the three experimental groups

Группы Сутки	1-е	5-е	9-е	15-е	21-е
Контрольная группа	$2100 \pm 1,13$	$1750,2 \pm 3,10$	$1650^* \pm 3,07$	$1350,2 \pm 2,13$	$1050,7^* \pm 2,01$
Группа ФДТ	$2118,5 \pm 2,3$	$1383^{**} \pm 4,30$	$945^{**} \pm 3,45$	$543^{**} \pm 3,9$	0
Группа АФДТ	$2119,3 \pm 3,56$	$1118^{***} \pm 4,37$	$832^{***} \pm 4,6$	0^{***}	0

* Достоверное различие ($p < 0,005$) с 1-ми сутками лечения. # Достоверное отличие от контрольной группы. ## Достоверное отличие от группы ФДТ и контрольной группы.

РИСУНОК 6. Динамика бактериальной обсемененности венозных язв в процессе фотодинамической терапии

FIGURE 6. Dynamics of bacterial insemmination of venous ulcers during photodynamic therapy



На пятые сутки уровень содержания микроорганизмов в контрольной группе составил 10^8 КОЕ/г, тогда как в группе ФДТ средний показатель количества микробов на 1 см^2 ткани снизился до 10^5 КОЕ/г. В группе АФДТ на пятый день лечения бактериальная обсемененность ран снизилась с 10^9 до 10^3 – 10^2 КОЕ/г (рис. 6).

На девятые сутки в контрольной группе количество микробных тел сократилось с 10^8 до 10^5 КОЕ/г. При этом в группе ФДТ высеваемость микроорганизмов составила 10^1 КОЕ/г, что ниже критического уровня, который способен вызвать инфекционный процесс. В группе АФДТ на 9-е сут. бактериальные посевы были отрицательные.

Сравнительный анализ показал, что в группах АФДТ и ФДТ на 9-е сут. лечения количество микробных тел стабильно снижалось ниже т. н. критического уровня (10^2 или 10^5 КОЕ – колониеобразующих единиц), в расчете на 1 см^2 ВТЯ, что способствовало более раннему купированию воспалительных изменений и созданию благоприятных условий для полной эпителизации венозных трофических язв.

Микробиологические исследования подтверждают клинические данные, полученные в ходе эксперимента, которые свидетельствуют о наиболее выраженном воздействии ФДТ с фотосенсибилизаторами «Фотосенс» и «Холосенс» на заживление венозных трофических язв.

Динамика морфологических изменений при заживлении венозных трофических язв

При патоморфологическом исследовании во всех трех группах в первые сутки эксперимента во фрагментах кожи, покрытых многослойным плоским ороговевающим эпителием, отмечался некроз эпителия, подэпителиальный и внутридермальный отек, а также воспалительная инфильтрация за счет сегментоядерных

и эозинофильных лейкоцитов с лимфоцитами. Отмечалось полнокровие кровеносных сосудов, мелкоочаговые кровоизлияния (рис. 7, 8).

На 9-е сут. эксперимента в контрольной группе определялись отдельно лежащие пласты некротизированного многослойного плоского эпителия с массивной лейкоцитарной инфильтрацией. Кроме подэпителиального и внутридермального отека отмечалась умеренно выраженная смешанная воспалительная инфильтрация, сегментоядерные лейкоциты, эозинофилы, макрофаги, лимфоциты.

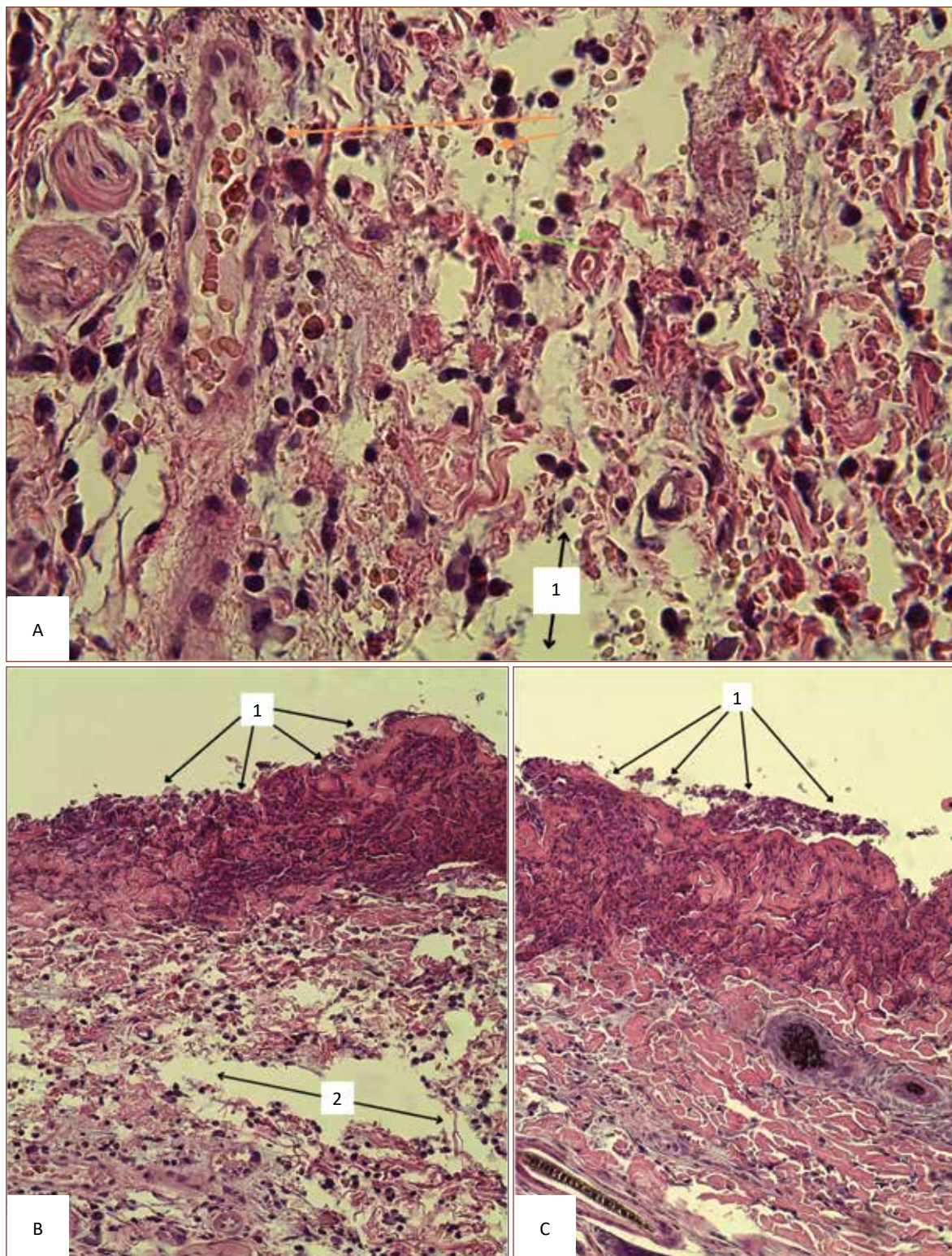
При этом в группе ФДТ формировались участки молодой грануляционной ткани с периферии. Кроме того, в дерме отмечено большое количество сосудов с активной клеточной реакцией вокруг них (рис. 9, 10).

В группе АФДТ сохранялись фокусы некротизированного эпителия, незначительный подэпителиальный и внутридермальный отек, а также умеренно выраженная воспалительная инфильтрация (в сравнении с контрольной и группой ФДТ), преимущественно представленная сегментоядерными и эозинофильными лейкоцитами, макрофагами, лимфоцитами. Определялись участки формирования молодой грануляционной ткани с появлением мелких полнокровных кровеносных сосудов.

На 15-е сут. от начала лечения выявились некоторые морфологические отличия у животных во всех трех группах по сравнению с предыдущим сроком наблюдения.

В контрольной группе препарат представлен отдельно лежащими пластами некротизированного многослойного плоского эпителия с массивной лейкоцитарной инфильтрацией. Подэпителиальный и внутридермальный отек выражены умеренно. Отмечается умеренно выраженная смешанная воспалительная инфильтрация с низкой тенденцией к заживлению.

РИСУНОК 7. Морфологическая картина на 1-е сутки. Микропрепарат. 40-кратное увеличение. Окраска гематоксилин-эозином
PICTURE 7. The morphological picture on the 1st day. Micrograph. Hematoxylin-eosin staining 40x



А – контрольная группа. 1 – некротический пласт, В – группа ФДТ. 2 – внутридермальный отек, С – группа АФДТ. Воспалительная инфильтрация за счет сегментоядерных и эозинофильных лейкоцитов (стрелка) с примесью лимфоцитов (двойная стрелка)

РИСУНОК 8. Морфологическая картина на 1-е сутки
FIGURE 8. Morphological picture on the 1st day

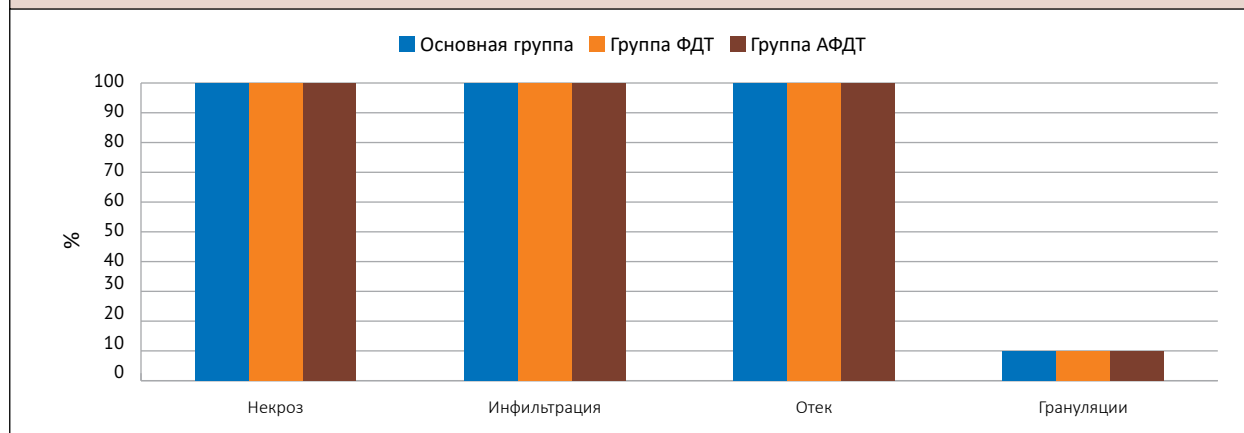
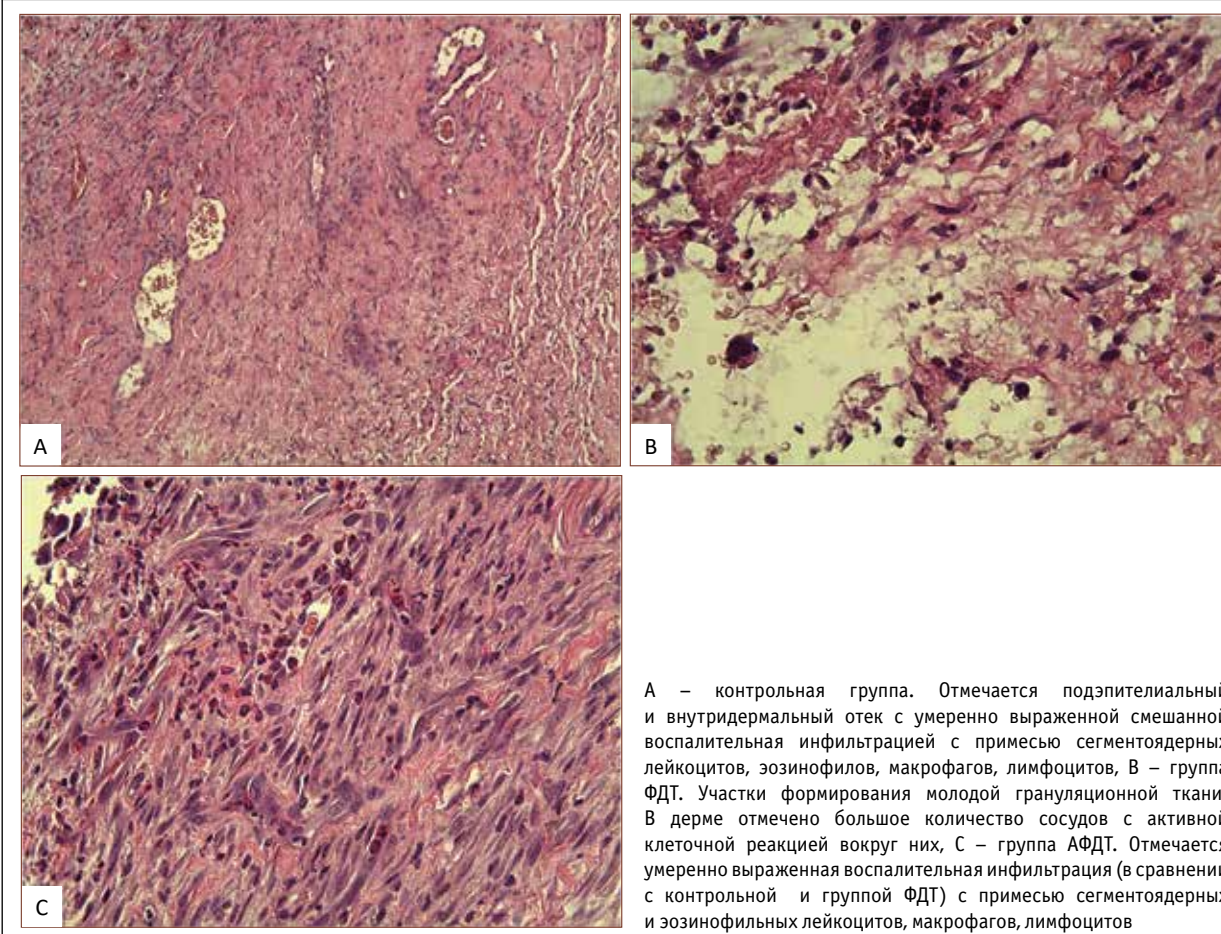


РИСУНОК 9. Морфологическая картина на 9-е сутки. Микропрепарат. Увеличение x40. Окраска гематоксилин-эозином

FIGURE 9. Morphological picture on the 9th day. Micrograph. Hematoxylin-eosin staining 40x



При гистологическом исследовании после фотодинамического воздействия (группа ФДТ) на трофические язвы венозного генеза с использованием фотосенсибилизатора «Фотосенс» на 15-е сут. присутствовал язвенный

дефект с признаками очищения дна язвы на участках с сохранной базальной мембраной эпидермиса и формированием нескольких слоев эпителиоцитов с очаговой гиперплазией клеточных элементов эпидермиса.

РИСУНОК 10. Динамика морфологических изменений в тканях после фотодинамического воздействия на 9-е сутки

FIGURE 10. Morphological changes in the tissues after photodynamic treatment on the 9th day

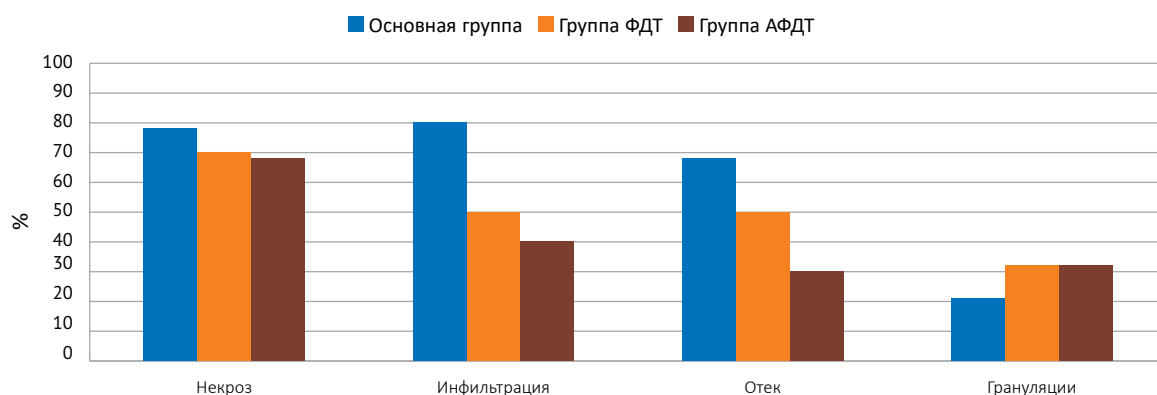
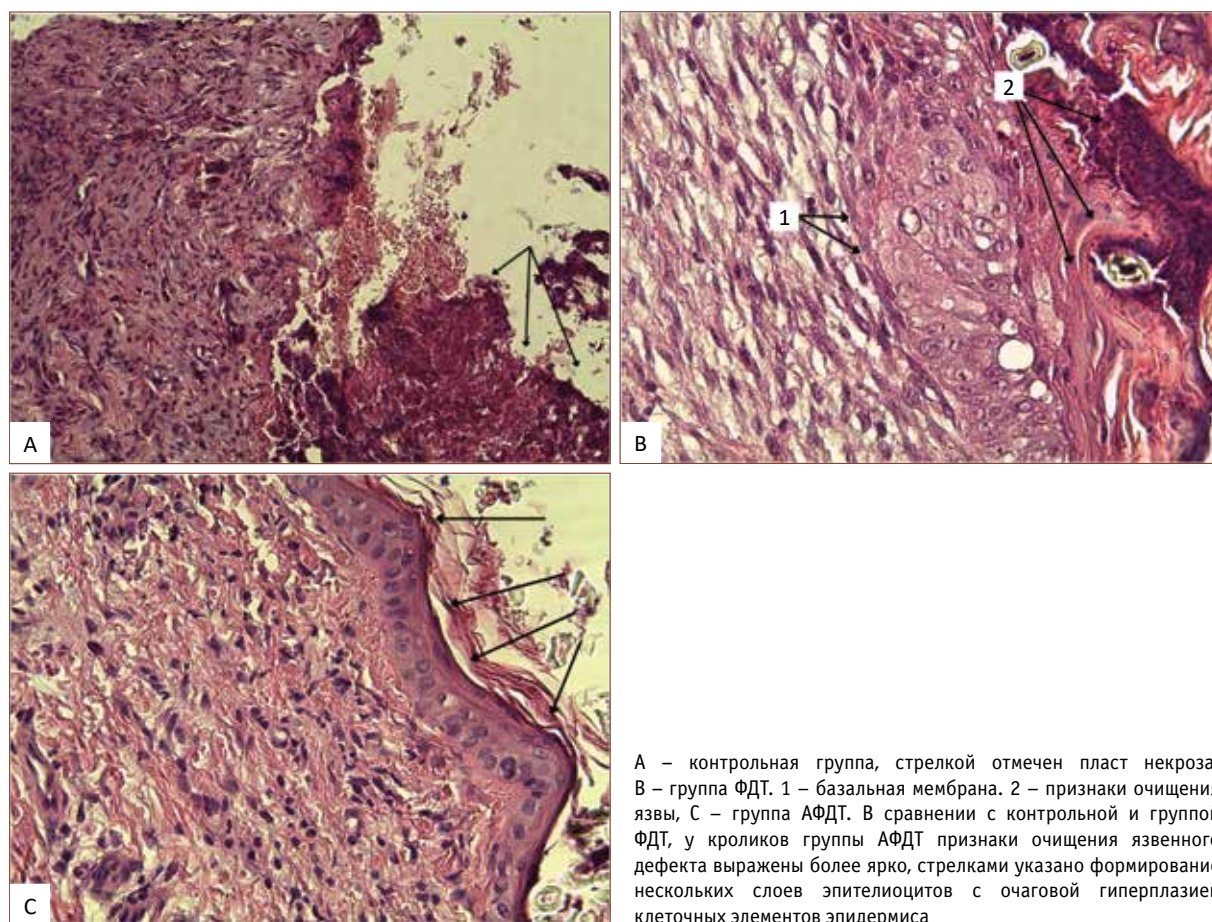


РИСУНОК 11. Морфологическая картина на 15-е сутки. Микропрепарат. Увеличение 20. Окраска гематоксилин-эозином

FIGURE 11. Morphological picture on the 15th day. Micrograph. Hematoxylin-eosin staining 40x

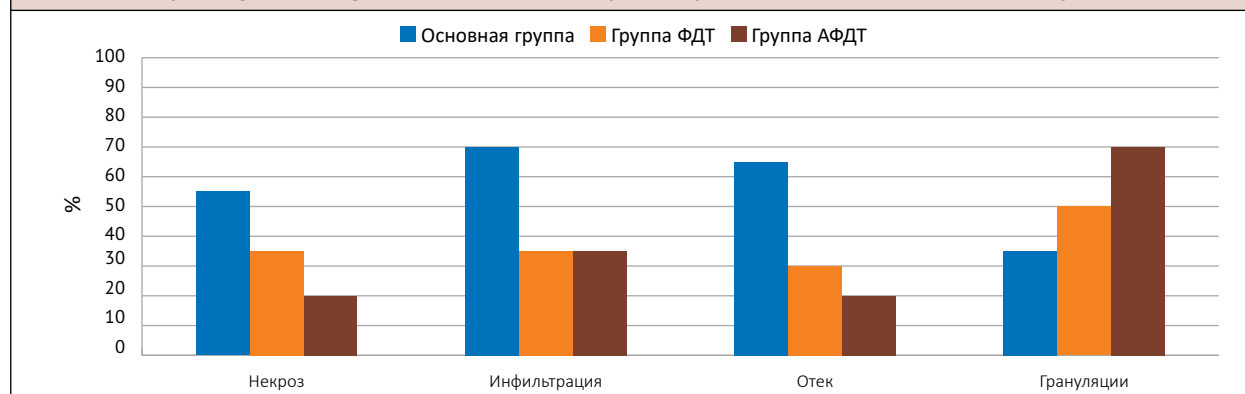


Подэпителиальный и внутридермальный отеки выражены незначительно. Вместе с тем в поле зрения выявлены единичные макрофаги и лимфоциты. В сравнении

с контрольной группой отечность тканей оказалась меньше на 30%, при этом количество грануляционной ткани оказалось больше на 20% ($p < 0,005$) (рис. 11).

РИСУНОК 12. Динамика морфологических изменений в тканях после фотодинамического воздействия на 15-е сутки

FIGURE 12. Morphological changes in the tissues after photodynamic treatment on the 15th day



В сравнении с контрольной и группой ФДТ у кроликов группы АФДТ признаки очищения язвенного дефекта выражены более ярко с сохранной базальной мембраной эпидермиса и формированием нескольких слоев эпителиоцитов с очаговой гиперплазией клеточных элементов эпидермиса. В поле зрения выявлены многочисленные макрофаги и лимфоциты. Обращает на себя внимание полнокровие кровеносных сосудов в сочетании с очаговым фиброзом. В сравнении с контрольной группой ФДТ отечность тканей оказалась меньше на 45%, при этом количество грануляционной ткани оказалось больше на 35% ($p < 0,005$) (рис. 12).

Наше исследование на морфологическом уровне показало преимущества использования ФДТ с ФС «Холосенс», что выразилось в уменьшении общей массы некротического детрита, увеличении скорости очищения трофической язвы, изменении количественного и качественного состава воспалительного инфильтрата, уменьшении отека дермы, а также в повышении скорости созревания грануляционной ткани и краевой эпителизации.

ВЫВОДЫ

Впервые было проведено экспериментальное исследование эффективности ФДТ и АФДТ в лечении ВТЯ. Результаты эксперимента позволяют достоверно доказать преимущества фотодинамических методик лечения ВТЯ. Полученные данные свидетельствуют об эффективности воздействия ФДТ и АФДТ на морфологическом уровне, проявившемся в ускорении очищения трофических язв, снижении массы некротического детрита, улучшении показателей клеточного состава, снижении отека дермы, а также в ускорении созревания грануляционной ткани по сравнению с группой контроля. Также ФДТ способствовала формированию полноценного соединительнотканного и эпителиального регенератов в более сжатые сроки.

Аналогичные по характеру изменения имеют место при оценке динамики микробного пейзажа. Показана высокая эффективность ФДТ и особенно АФДТ в отношении всех видов патогенной микрофлоры в ВТЯ. Положительная динамика снижения бактериальной контаминации достоверно превосходила показатели контрольной группы.

Результаты нашего эксперимента показали, что воздействие ФДТ и АФДТ способствует снижению микробной нагрузки с параллельным ускорением процессов репарации и регенерации тканей в области ВТЯ. Это находит подтверждение в ряде других работ, однако в них не был изучен эффект АФДТ в лечении ВТЯ [19]. Мы показали, что АФДТ имеет преимущества по сравнению со стандартными методиками фотодинамической терапии. По всей видимости, это может быть связано с бактерицидным действием АФДТ на фоне активного захвата фотосенсибилизатора бактериями, при этом хелатированные формы ФС лучше пенетрируют сквозь мембрану микроорганизмов, в т. ч. и грамотрицательной флоры. Таким образом, использование АФДТ с фотосенсибилизатором «Холосенс» может быть показано при неэффективности стандартной антибактериальной терапии, что является особенно актуальным в группе возрастных пациентов с неблагоприятным коморбидным фоном.

Полученные результаты экспериментального исследования свидетельствуют о высокой эффективности ФДТ и АФДТ в лечении венозных язв. Также эти методы имеют существенные преимущества над стандартными методами лечения ВТЯ и открывают перспективу использования метода АФДТ как нового эффективного способа лечения венозных трофических язв.

Поступила / Received 10.07.2022

Поступила после рецензирования / Revised 05.08.2022

Принята в печать / Accepted 15.10.2022

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Weller C.D., Richards C., Turnour L., Patey A.M., Russell G., Team V. Barriers and enablers to the use of venous leg ulcer clinical practice guidelines in Australian primary care: A qualitative study using the theoretical domains framework. *Int J Nurs Stud.* 2020;103:103503. <https://doi.org/10.1016/j.ijnurstu.2019.103503>.
- Nicolaides A., Kakkos S., Baekgaard N., Comerota A., de Maeseneer M., Eklof B. et al. Management of chronic venous disorders of the lower limbs. Guidelines According to Scientific Evidence. *Int Angiol.* 2014;33(2):87–208. <https://doi.org/10.23736/S0392-9590.18.03999-8>.
- Darwin E., Liu G., Kirsner R.S., Lev-Tov H. Examining risk factors and preventative treatments for first venous leg ulceration: a cohort study. *J Am Acad Dermatol.* 2021;84(1):76–85. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2019.12.046>.
- Serra R., Ielapi N., Barbetta A., de Franciscis S. Skin tears and risk factors assessment: a systematic review on evidence based medicine. *Int Wound J.* 2018;15(1):38–42. <https://doi.org/10.1111/iwj.12815>.
- Vasudevan B. Venous leg ulcers: Pathophysiology and Classification. *Indian Dermatol Online J.* 2014;5(3):366–370. <https://doi.org/10.4103/2229-5178.137819>.
- Amir O., Liu A., Chang A.L.S. Stratification of highest-risk patients with chronic skin ulcers in a Stanford retrospective cohort includes diabetes, need for systemic antibiotics, and albumin levels. *Ulcers.* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/767861>.
- Raffetto J.D., Ligi D., Maniscalco R., Khalil R.A., Mannello F. Why Venous Leg Ulcers Have Difficulty Healing: Overview on Pathophysiology, Clinical Consequences, and Treatment. *J Clin Med.* 2020;10(1):29. <https://doi.org/10.3390/jcm10010029>.
- Bowler P., Murphy C., Wolcott R. Biofilm exacerbates antibiotic resistance: Is this a current oversight in antimicrobial stewardship? *Antimicrob Resist Infect Control.* 2020;9(1):162. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00830-6>.
- Каторкин С.Е., Насыров М.В. Применение фотодинамической терапии в местном лечении и предоперационной подготовке трофических язв венозной этиологии. *Новости хирургии.* 2015;23(2):182–188. Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/primenenie-fotodinamicheskoy-terapii-v-mestnom-lechenii-i-predoperatsionnoy-podgotovke-troficheskikh-yazv-venoznoy-etologii>.
- Szeimies R.M., Karrer S. Photodynamic therapy-trends and new developments. *Hautarzt.* 2021;72(1):27–33. (In German.) <https://doi.org/10.1007/s00105-020-04737-6>.
- Mosti G., Picerni P., Licau M., Mattaliano V. Photodynamic therapy in infected venous and mixed leg ulcers: a pilot experience. *J Wound Care.* 2018;27(12):816–821. <https://doi.org/10.12968/jowc.2018.27.12.816>.
- Corsi A., Lecci P.P., Bacci S., Cappugi P., Pimpinelli N. Early activation of fibroblasts during PDT treatment in leg ulcers. *G Ital Dermatol Venereol.* 2016;151(3):223–9. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24927172>.
- Gunaydin G., Gedik M.E., Ayan S. Photodynamic Therapy – Current Limitations and Novel Approaches. *Front Chem.* 2021;9:691697. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.691697>.
- Torabi S., Joharchi K., Kalhori K.A., Sohrabi M., Fekrazad R. Evaluation of antimicrobial photodynamic therapy on wounds infected by *Staphylococcus aureus* in animal models. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020;102092. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102092>.
- Sun Y., Ogawa R., Xiao B.H., Feng Y.X., Wu Y., Chen L.H. et al. Antimicrobial photodynamic therapy in skin wound healing: A systematic review of animal studies. *Int Wound J.* 2020;17(2):285–299. <https://doi.org/10.1111/iwj.13269>.
- Sahu K., Sharma M., Gupta P.K. Modulation of inflammatory response of wounds by antimicrobial photodynamic therapy. *Laser Therapy.* 2015;24(3):201–208. <https://doi.org/10.5978/islsm.15-0R-13>.
- Зинатуллин Р.М., Гизатуллин Т.Р., Павлов В.Н., Катаев В.А., Фархутдинов Р.Р., Баймурзина Ю.Л. и др. *Способ моделирования трофической раны в эксперименте.* Патент RU 2510083 C1, 2014. Режим доступа: https://rusneb.ru/catalog/000224_000128_0002510083_20140320_C1_RU/?ysclid=lagz5nm34e40515536.
- Zinatullin R.M., Gizatullin T.R., Pavlov V.N., Kataev V.A., Farkhutdinov R.R., Baymurzina Yu.L. et al. *Method for simulating trophic wound in experiment.* Patent RU 2510083 C1, 2014. (In Russ.) Available at: https://rusneb.ru/catalog/000224_000128_0002510083_20140320_C1_RU/?ysclid=lagz5nm34e40515536.
- Lipatova A.A., Yusova E.A., Lukyanets. Supramolecular complexation of the cationic derivative of Zn (II) phthalocyanine and sodium alginate in mixed aqueous solutions. *Photochem Photobiol Sci.* 2018;364:588–594. Available at: www.elsevier.com/locate/jphotochem.
- Karner L., Drechsler S., Metzger M., Hacobian A., Schädli B., Slezak P. et al. Antimicrobial photodynamic therapy fighting polymicrobial infections – a journey from in vitro to in vivo. *Photochem Photobiol Sci.* 2020;19(10):1332–1343. <https://doi.org/10.1039/d0pp00108b>.

Вклад авторов:

Концепция статьи – Туркин П.Ю., Сомов Н.О., Эттингер А.П.

Концепция и дизайн исследования – Туркин П.Ю., Болдин Б.В., Сомов Н.О.

Написание текста – Сомов Н.О.

Сбор и обработка материала – Сомов Н.О., Мидибер К.Ю., Михалева Л.М., Кузьмин С.Г., Лощенов В.Б.

Обзор литературы – Сомов Н.О., Туркин П.Ю.

Перевод на английский язык – Сомов Н.О.

Анализ материала – Туркин П.Ю., Сомов Н.О., Эттингер А.П., Михалева Л.М., Мидибер К.Ю.

Статистическая обработка – Сомов Н.О.

Редактирование – Туркин П.Ю., Эттингер А.П., Сомов Н.О., Богачев В.Ю.

Утверждение окончательного варианта статьи – Болдин Б.В.

Contribution of authors:

Concept of the article – Pavel Yu. Turkin, Nikita O. Somov, Alexander P. Oettinger

Study concept and design – Pavel Yu. Turkin, Boris V. Boldin, Nikita O. Somov

Text development – Nikita O. Somov

Collection and processing of material – Nikita O. Somov, Konstantin Yu. Midiber, Liudmila M. Mikhaleva, Sergey G. Kuzmin,

Viktor B. Loschenov

Literature review – Nikita O. Somov, Pavel Yu. Turkin

Translation into English – Nikita O. Somov

Material analysis – Pavel Yu. Turkin, Nikita O. Somov, Alexander P. Oettinger, Liudmila M. Mikhaleva, Konstantin Yu. Midiber

Statistical processing – Nikita O. Somov

Editing – Pavel Yu. Turkin, Alexander P. Oettinger, Nikita O. Somov, Vadim Yu. Bogachev

Approval of the final version of the article – Boris V. Boldin

Информация об авторах:

Болдин Борис Валентинович, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой факультетской хирургии №2, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова; 117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1; <https://orcid.org/0000-0003-4488-9123>; facultysurgery@gmail.com

Туркин Павел Юрьевич, к.м.н., доцент кафедры факультетской хирургии №2, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова; 117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1; <http://orcid.org/0000-0002-6262-4770>; pavelturkin@gmail.com

Эттингер Александр Павлович, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой организации биомедицинских исследований, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова; 117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1; <http://orcid.org/0000-0001-9894-0671>; oett@rsmu.ru

Богачев Вадим Юрьевич, д.м.н., профессор, кафедра факультетской хирургии №2, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова; 117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1; <http://orcid.org/0000-0002-3940-0787>; vadim.bogachev63@gmail.com

Сомов Никита Олегович, ассистент кафедры факультетской хирургии №2, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова; 117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1; nikitasomer@gmail.com

Кузьмин Сергей Георгиевич, заместитель директора, Международный научный и клинический центр «Интермедбиофизхим»; 103752, Россия, Москва, Нижний Кисельный пер., д. 5/23, стр. 1; руководитель научной части, Научно-исследовательский институт органических полупродуктов и красителей; 141701, Россия, Московская обл., Долгопрудный, Лихачевский проезд, д. 7; <https://orcid.org/0000-0003-3753-3276>; kuzmin@mail.ru

Лощенов Виктор Борисович, д.ф.-м.н., профессор, Институт общей физики имени А.М. Прохорова Российской академии наук; 119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, д. 38; заведующий лабораторией лазерной биоспектроскопии, отдел светоиндуцированных поверхностных явлений, Центр естественно научных исследований; 119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, д. 38, корп. Л-2; <https://orcid.org/0000-0002-0507-2367>; loschenov@mail.ru

Михалева Людмила Михайловна, академик РАН, д.м.н., профессор, директор, Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына Российского научного центра хирургии имени академика Б.В. Петровского; 117418, Россия, Москва, ул. Цюрупы, д. 3; <http://orcid.org/0000-0003-2052-914X>; mikhalevalm@yandex.ru

Мидибер Константин Юрьевич, научный сотрудник лаборатории клинической морфологии, Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына Российского научного центра хирургии имени академика Б.В. Петровского; 117418, Россия, Москва, ул. Цюрупы, д. 3; врач-патологоанатом, Городская клиническая больница №31 Департамента здравоохранения г. Москвы; 119415, Россия, Москва, ул. Лобачевского, д. 42, стр. 1; ассистент кафедры патологической анатомии медицинского института, Российский университет дружбы народов; 117198, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6; <https://orcid.org/0000-0002-1426-968X>; midiberkonst@gmail.com

Information about the authors:

Boris V. Boldin, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of Department of Intermediate Level Surgery No. 2, Pirogov Russian National Research Medical University; 1, Ostrovityanov St., Moscow, 117997, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-4488-9123>; facultysurgery@gmail.com

Pavel Yu. Turkin, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Intermediate Level Surgery No. 2, Pirogov Russian National Research Medical University; 1, Ostrovityanov St., Moscow, 117997, Russia; <http://orcid.org/0000-0002-6262-4770>; pavelturkin@gmail.com

Alexander P. Oettinger, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of Department of Organization of Biomedical Research Projects, Pirogov Russian National Research Medical University; 1, Ostrovityanov St., Moscow, 117997, Russia; <http://orcid.org/0000-0001-9894-0671>; oett@rsmu.ru

Vadim Yu. Bogachev, Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Intermediate Level Surgery No. 2, Pirogov Russian National Research Medical University; 1, Ostrovityanov St., Moscow, 117997, Russia; <http://orcid.org/0000-0002-3940-0787>; vadim.bogachev63@gmail.com

Nikita O. Somov, Teaching Assistant, Department of Intermediate Level Surgery No. 2, Pirogov Russian National Research Medical University; 1, Ostrovityanov St., Moscow, 117997, Russia; nikitasomer@gmail.com

Sergey G. Kuzmin, Deputy Director, International Research and Clinical Center 'Intermedbiophiskhim'; Bldg. 1, 5/23, Nizhniy Kiselnyy Per., Moscow, 103752, Russia; Scientific Director, Research Institute of Organic Intermediates and Dyes; 7, Likhachevskiy Proezd, Dolgoprudnyi, Russia, Moscow Region, 123995, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-3753-3276>; kuzmin@mail.ru

Victor B. Loschenov, Dr. Sci. (Phys.-Math.), Professor, Prokhorov General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences; 38, Vavilov St., Moscow, 119991, Russia; Head of Laser Biospectroscopy Laboratory, Light-Induced Surface Phenomena Department, Natural Sciences Center; Block L-2, 38, Vavilova St., Moscow, 125252, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-0507-2367>; loschenov@mail.ru

Liudmila M. Mikhaleva, Acad. RAS, Dr. Sci. (Med.), Professor, Director, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Petrovsky National Research Centre of Surgery; 3, Tsyurupa St., Moscow, 117418, Russia; <http://orcid.org/0000-0003-2052-914X>; mikhalevalm@yandex.ru

Konstantin Yu. Midiber, Researcher, Clinical Morphology Laboratory, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Petrovsky National Research Centre of Surgery; 3, Tsyurupa St., Moscow, 117418, Russia; Anatomopathologist, City Clinical Hospital No.31; Bldg. 1, 42, Lobachevskogo St., Moscow, 42119415, Russia; Teaching Assistant, Department of Pathologic Anatomy at the Medical Institute, Peoples' Friendship University of Russia; 6, Miklukho-Maklai St., Moscow, 117198, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-1426-968X>; midiberkonst@gmail.com