

**Влияние фотодинамической терапии заболеваний периодонта на биохимическую составляющую общего состояния лабораторных животных в эксперименте**

*Белорусская медицинская академия последипломного образования*

Целью нашей работы была оценка эффективности ФДТ по данным биохимических исследований в условиях *in vivo*. Исследования проведены на лабораторных крысах, у которых проводилось моделирование БП с последующим проведением различных схем фотодинамической терапии. Схемы лечения с настойкой эвкалипта и с синим светом, с раствором хлорофиллипта и синим светом и с раствором хлорофиллипта и красным светом оказывают благотворное воздействие на биохимические параметры крови лабораторных животных, уменьшая проявления системного иммуно-воспалительного ответа организма. Схема с настойкой эвкалипта и красным светом, а также традиционная антимикробная фотодинамическая терапия способствуют временному ухудшению некоторых биохимических параметров.

ключевые слова: фотодинамическая терапия, заболевания периодонта, экспериментальных животных, биохимические показатели

Ряд клинико-эпидемиологических исследований подтверждают наличие взаимосвязи между заболеваниями периодонта и соматической патологией, в частности атеросклерозом и другими поражениями сердечно-сосудистой системы.

Концепции, описывающие связь этих процессов, основаны на том, что на развитие болезней периодонта весь организм человека реагирует системной иммуно-воспалительной реакцией и изменениями в системе гемостаза [1]. Высокоинформативными показателями системного ответа организма являются уровень с-реактивного белка, щелочной фосфотазы, глюкозы и  $\alpha$ -амилазы. Изменения этих данных могут быть использованы для оценки динамики заболеваний и эффективности различных методик лечения.

В то же время болезни периодонта остаются в первую очередь местным инфекционно-воспалительным процессом, а потому использование системных антимикробных препаратов оправдано только в самых тяжелых случаях патологии. Традиционные местные антисептические препараты оказываются недостаточно эффективными из-за сложностей обеспечения длительной экспозиции воздействия при контакте со слюной. Остаются нерешенными проблемы побочных эффектов и развития микробной устойчивости к антисептикам и антибиотикам. Все это служит основанием для поиска новых эффективных методов лечения болезней периодонта. Одним из таковых является фотодинамическая терапия (ФДТ).

Целью нашей работы было оценить эффективность применения новых схем ФДТ по биохимическим параметрам в эксперименте *in vivo*.

Материалы и методы: Нами были проведены подострые опыты на животных 70 лабораторных крыс-самцов рода *Wistar* из одного помета весом около 300 г., включающие экспериментальное моделирование патологии периодонта, апробацию способа коррекции нарушений методами фотодинамической терапии с применением хлорофиллипта и настойки эвкалипта в качестве фотосенсибилизаторов, активизируемых синим светом с длиной волны 450 нм и красным светом с длиной волны 630 нм. Контроль эффективности способа лечения болезней периодонта осуществлялся через 7 суток после лечения (через 11—12 дней после моделирования болезней периодонта).

Для моделирования хронического периодонтита у крыс под наркозом разрушалась периодонтальная связка фронтальных резцов нижней челюсти. В образовавшийся карман помещался зубной камень, собранный у пациентов с патологией периодонта. В пришеечной

области этих зубов накладывались лигатуры [2]. При выведении животных из эксперимента производился забор крови, челюстных костей и мягких тканей ротовой полости для проведения морфометрических, биохимических и гематологических исследований.

№ группы	Вид животных	Количество животных	Ход операции
1-я группа	Здоровые крысы (контроль)	10	Крысы не подвергаются никаким видам экспериментального воздействия, получают питание и воду ad libitum, через 12 дней выводятся из эксперимента.
2-я группа	Крысы с хроническим периодонтитом (пассивный контроль)	10	У крыс моделируется искусственный хронический периодонтит за счет надевания лигатур на фронтальные резцы нижней челюсти под общим наркозом. Через 4—5 дней ткани периодонта обрабатываются физиологическим раствором однократно в течение 5 мин. Через 7 дней после манипуляции животные выводятся из эксперимента
3-я группа	Крысы с искусственно вызванным периодонтитом, лечение с использованием настойки эвкалипта и синего света (экспериментальная схема лечения №1)	10	У крыс моделируется искусственный хронический периодонтит за счет надевания лигатур на фронтальные резцы нижней челюсти под общим наркозом. Через 4—5 дней ткани периодонта в течение 7--10 мин обрабатываются раствором настойки эвкалипта, затем облучаются светом синего светодиодного лазера с длиной волны 450 нм, мощностью 125 мВт/ см <sup>2</sup> в течение 5 мин. Через 7 дней после манипуляции животные выводятся из эксперимента

4-я группа	<p>Крысы с хроническим периодонтитом, леченые с использованием хлорофиллипта и синего света (экспериментальная схема лечения №2)</p>	10	<p>У крыс моделируется искусственный хронический периодонтит за счет надевания лигатур на фронтальные резцы нижней челюсти под общим наркозом. Через 4—5 дней ткани периодонта в течение 5 мин обрабатываются 0,2% спиртовым раствором хлорофиллипта, а затем облучаются светом синего светодиодного лазера с длиной волны 450 нм, частотой колебаний 50 Гц, мощностью 200 мДж/см<sup>2</sup> в течение 5 мин. Через 7 дней после манипуляции животные выводились из эксперимента.</p>
5-я группа	<p>Крысы с хроническим периодонтитом, леченые с использованием хлорофиллипта и красного света (экспериментальная схема лечения №3)</p>	10	<p>У крыс моделируется искусственный хронический периодонтит за счет надевания лигатур на фронтальные резцы нижней челюсти под общим наркозом. Через 4—5 дней ткани периодонта в течение 5 мин обрабатываются 0,2% спиртовым раствором хлорофиллипта, а затем облучаются светом красного светодиодного лазера с длиной волны 630 нм, частотой колебаний 50 Гц, мощностью 200 мДж/см<sup>2</sup> в течение 5 мин. Через 7 дней после манипуляции животные выводились из эксперимента.</p>
6-я группа	<p>Крысы с искусственно вызванным периодонтитом, лечение с использованием настойки эвкалипта и красного света.(экспериментальная схема лечения №4)</p>	10	<p>У крыс моделируется искусственный хронический периодонтит за счет надевания лигатур на фронтальные резцы нижней челюсти под общим наркозом. Через 4—5 дней ткани периодонта в течение 7--10 мин обрабатываются раствором настойки эвкалипта, затем облучаются светом красного светодиодного лазера</p>

			с длиной волны 670 нм, мощностью 125 мВт/ см <sup>2</sup> в течение 5 мин. Через 7 дней после манипуляции животные выводятся из эксперимента
7-я группа	Крысы с искусственно вызванным периодонтитом, леченые с использованием хлорина еб и красного света (активный контроль)	10	У крыс моделируется искусственный хронический периодонтит за счет надевания лигатур на фронтальные резцы нижней челюсти под общим наркозом. Через 4—5 дней ткани периодонта в течение 7--10 мин обрабатываются раствором метиленового синего, затем облучаются светом красного светодиодного лазера с длиной волны 670 нм, мощностью 125 мВт/ см <sup>2</sup> в течение 5 мин. Через 7 дней после манипуляции животные выводятся из эксперимента.

Основой для выбора фотосенсибилизатора послужили ранее проведенные стендовые исследования на базе Института физики им. Б.И. Степанова Национальной академии наук Беларуси [3,4,5]. Препараты выбирались из числа зарегистрированных Фармкомитетом Республики Беларусь.

Проведены исследования спектрально-люминесцентных и абсорбционных характеристик хлорофиллсодержащих лекарственных препаратов на основе экстрактов и настоек эвкалипта: хлорофиллипта, галенофиллипта и настойки эвкалипта.

На основании изучения спектров поглощения, флуоресценции, возбуждения флуоресценции, квантового выхода флуоресценции был сделан вывод, что все вышеуказанные хлорофиллсодержащие соединения способны выступать в качестве фотосенсибилизаторов совместно с источниками излучения (сертифицированными в республике терапевтическими аппаратами на основе лазерных и светодиодных источников видимой области спектра).

Моделирование болезней периодонта и последующее лечение животных проводилось под общим неингаляционным наркозом. Животные выводились из эксперимента максимальной дозировкой тиопентала натрия.

#### Результаты и обсуждение

В результате биохимических исследований крови экспериментальных животных, подвергшихся моделированию маргинальных периодонтитов, получены противоречивые данные. Моделирование БП вызывало повышение всех показателей, кроме глюкозы. Использование различных схем лечения фотодинамической терапии (1–3 схема) способствовало возвращению большинства параметров к значениям интактных особей.

	Здоровые животные	Животные с БП	Схема лечения №1	Схема лечения №2	Схема лечения №3	Схема лечения №4	Активный контроль
CRP	2,40±0,12	10,80±1,69	6,82±0,72	6,92±0,53	6,37±0,49	29,74±8,48	8,17±0,32
А-амилаза	3257,33 ± 141,33	4151,80 ± 288,08	3817,60 ± 284,0	4170,10 ± 387,98	4413,63 ± 482,69	4791,60 ± 383,88	4481,64 ± 449,59
ЩФ	151,72 ± 4,50	343,93 ± 65,78	216,25 ± 24,55	185,46 ± 11,15	270,24 ± 43,77	341,93 ± 27,82	177,47 ± 18,62
глюкоза	6,30 ± 0,24	5,92 ± 0,19	6,59 ± 0,15	6,21 ± 0,26	7,26 ± 0,19	5,21 ± 0,14	7,79 ± 0,34

Показатель воспалительной активности с-реактивный белок (CRP) в серии с БП поднимался до 10,80±1,69 мг/л при 2,40±0,12 мг/л в серии интактных особей (рис.1).

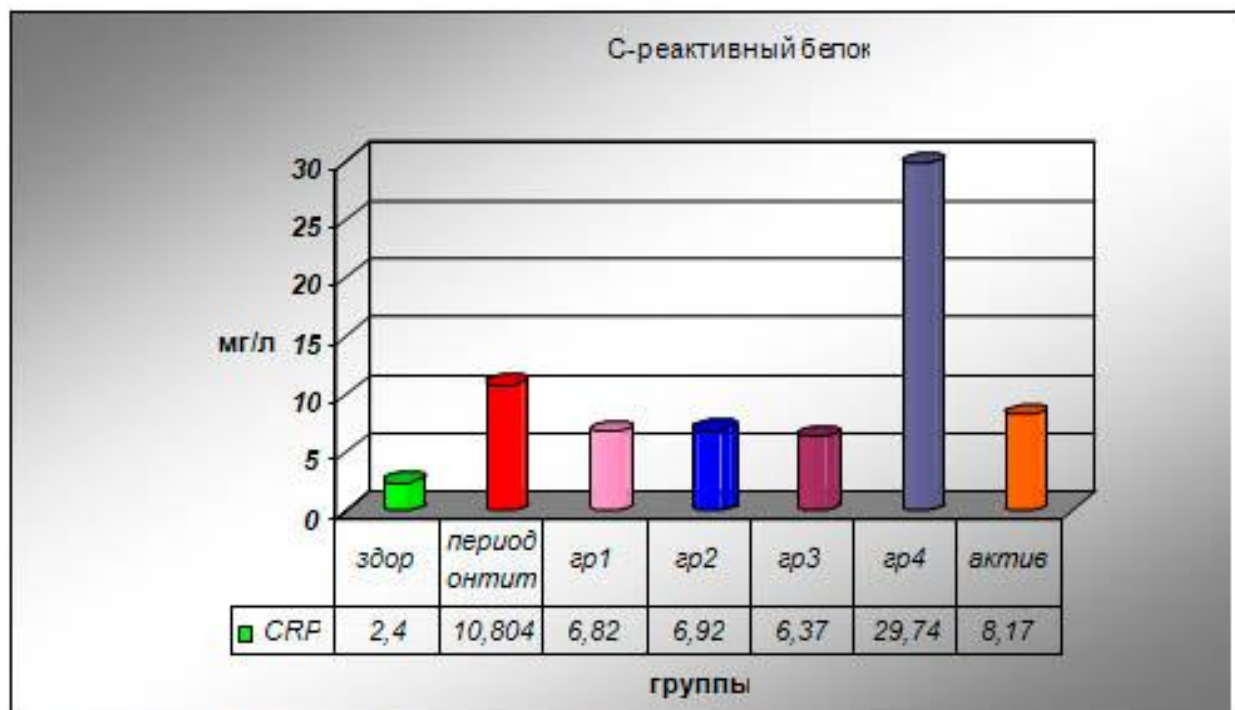


Рис.1. Уровень С-реактивного белка у экспериментальных животных

Применение ранее широко изученной схемы ФДТ с метиленовым синим вызывало снижение этого показателя до 8,17±0,32 мг/л ( $p < 0,05$  по отношению к больным животным и  $p < 0,001$  по отношению к здоровым животным). Разработанные нами схемы лечения дали следующие результаты:

ФДТ с настойкой эвкалипта и синим светом: 6,82±0,72 мг/л, что достоверно меньше показателя CRP у животных, леченных по традиционной схеме, но достоверно выше по отношению к интактным особям ( $p < 0,01$  по отношению к здоровым и  $p < 0,05$  по отношению к больным животным).

ФДТ с раствором хлорофиллипта и синим светом: 6,92±0,53 мг/л ( $p < 0,001$  по отношению к здоровым,  $p < 0,01$  по отношению к больным животным и  $p > 0,05$  по отношению к группе активного контроля), с показателем CRP интактных особей различия недостоверны.

ФДТ с раствором хлорофиллипта и красным лазером: 6,37±0,49 мг/л ( $p < 0,001$  по отношению к здоровым,  $p < 0,01$  по отношению к больным животным и  $p < 0,05$  по отношению к группе активного контроля)

ФДТ с настойкой эвкалипта и красным лазером: 29,74±8,48 мг/л, что достоверно выше, чем у здоровых животных и животных, леченных по традиционной схеме ( $p < 0,05$ ).

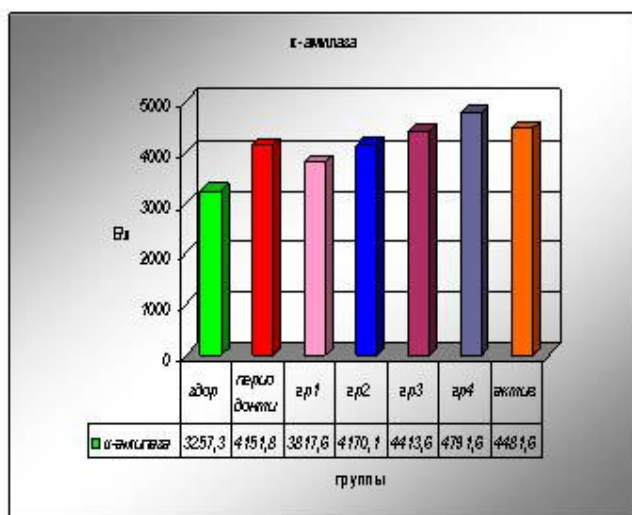


Рис.2. Уровень α-амилазы у экспериментальных животных.

α-амилаза. В группе здоровых животных этот маркер воспаления был равен  $3257,33 \pm 141,33$  Е/л (рис.2). У больных животных он поднимался до  $4151,80 \pm 288,08$  Е/л. Применение ранее широко изученной схемы ФДТ с метиленовым синим приводило к еще более существенно повышению уровня этого показателя --  $4481,64 \pm 449,59$  Е/л ( $p < 0,05$  по отношению к здоровым животным). Разработанные нами схемы лечения дали следующие результаты:

ФДТ с настойкой эвкалипта и синим светом:  $3817,60 \pm 284,00$  Е/л ( $p > 0,05$  по отношению к здоровым, больным животным и группе активного контроля).

ФДТ с раствором хлорофиллипта и синим светом:  $4170,1 \pm 387,98$  Е/л ( $p > 0,05$  по отношению к здоровым, больным животным и группе активного контроля).

ФДТ с раствором хлорофиллипта и красным лазером:  $4413,63 \pm 482,69$  Е/л ( $p > 0,05$  по отношению к здоровым, больным животным и группе активного контроля)

ФДТ с настойкой эвкалипта и красным лазером:  $4791,60 \pm 383,88$  Е/л ( $p < 0,01$  по отношению к интактным особям,  $p > 0,05$  по отношению к больным животным и группе активного контроля).

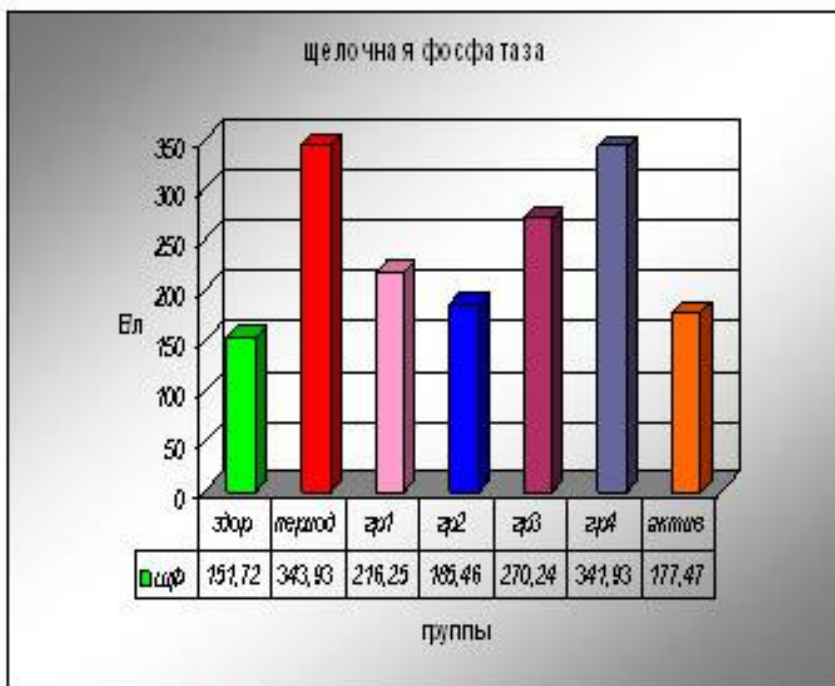


Рис.3. Уровень щелочной фосфатазы у экспериментальных животных

Щелочная фосфатаза. В группе здоровых животных этот маркер воспаления был равен  $151,72 \pm 4,50$  Е/л (рис.3). У больных животных он поднимался до  $343,93 \pm 65,78$  Е/л. Применение ранее широко изученной схемы ФДТ с метиленовым синим вызывало снижение этого показателя до  $177,47 \pm 18,62$  Е/л ( $p < 0,05$  по отношению к группе животных с БП). Разработанные нами схемы лечения дали следующие результаты:

ФДТ с настойкой эвкалипта и синим светом:  $216,25 \pm 24,55$  Е/л, что достоверно больше показателя ЩФ у здоровых животных ( $p < 0,05$  по отношению к здоровым животным,  $p > 0,05$  по отношению к группе активного контроля и крысам с БП).

ФДТ с раствором хлорофиллипта и синим светом:  $185,46 \pm 11,15$  г/л ( $p < 0,05$  по отношению к интактным и больным особям,  $p > 0,05$  по к группе активного контроля)

ФДТ с раствором хлорофиллипта и красным лазером:  $270,24 \pm 43,77$  Е/л ( $p < 0,05$  по отношению к здоровым животным,  $p > 0,05$  по отношению к больным животным и группе активного контроля)

ФДТ с настойкой эвкалипта и красным лазером:  $341,93 \pm 27,82$  Е/л ( $p > 0,05$  по отношению больным животным,  $p < 0,001$  по отношению к здоровым и  $p < 0,01$  по отношению к группе активного контроля).

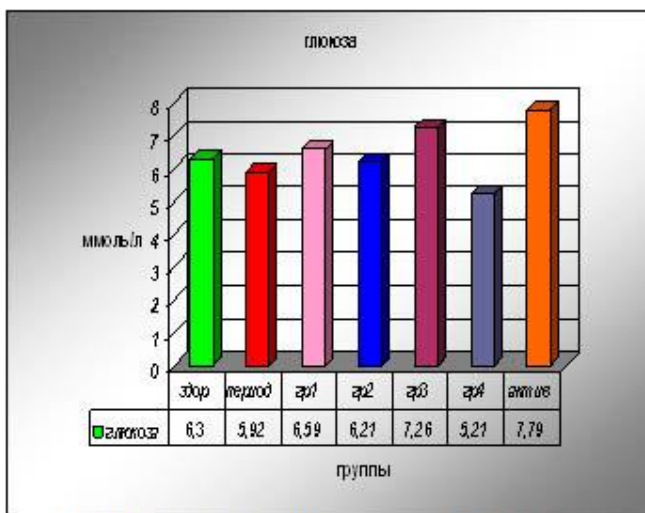


Рис.4. Уровень глюкозы у экспериментальных животных.

Глюкоза. В группе здоровых животных этот маркер воспаления был равен  $6,30 \pm 0,24$  ммоль/л (рис.4). У больных животных он опустился до  $5,92 \pm 0,19$  ммоль/л. Применение ранее широко изученной схемы ФДТ с метиленовым синим вызывало рост этого показателя до  $7,79 \pm 0,34$  ммоль/л ( $p < 0,01$  по отношению к здоровым крысам и животным с БП). Разработанные нами схемы лечения дали следующие результаты:

ФДТ с настойкой эвкалипта и синим светом:  $6,59 \pm 0,15$  ммоль/л, что достоверно меньше показателя глюкозы у животных группы активного контроля и больше показателя больных крыс ( $p < 0,01$ ); достоверных различий с группой интактных особей не выявлено ( $p > 0,05$ ).

ФДТ с раствором хлорофиллипта и синим светом:  $6,21 \pm 0,26$  ммоль/л ( $p > 0,05$  по отношению к здоровым животным,  $p < 0,01$  по отношению к группе активного контроля,  $p < 0,05$  по отношению к больным животным).

ФДТ с раствором хлорофиллипта и красным лазером:  $7,26 \pm 0,189$  ммоль/л, что достоверно больше показателя глюкозы у здоровых и больных животных ( $p < 0,05$ ). Достоверных отличий с группой активного контроля не выявлено ( $p > 0,05$ ).

ФДТ с настойкой эвкалипта и красным лазером:  $5,21 \pm 0,14$  ммоль/л, что достоверно меньше показателя глюкозы у животных группы активного контроля и животных с БП без лечения ( $p < 0,001$  и  $p < 0,01$  соответственно). Достоверных различий со здоровыми животными не выявлено.

Сравнительный анализ эффективности и безопасности предлагаемых схем ФДТ и антимикробной ФДТ с метиленовым синим.

Хотя по всем исследованным биохимическим параметрам в группе, леченой по схеме №1, отмечается нормализация показателей крови, статистически значимые различия с группой активного контроля наблюдается только по уровню глюкозы ( $p < 0,01$ ) (рис.5).



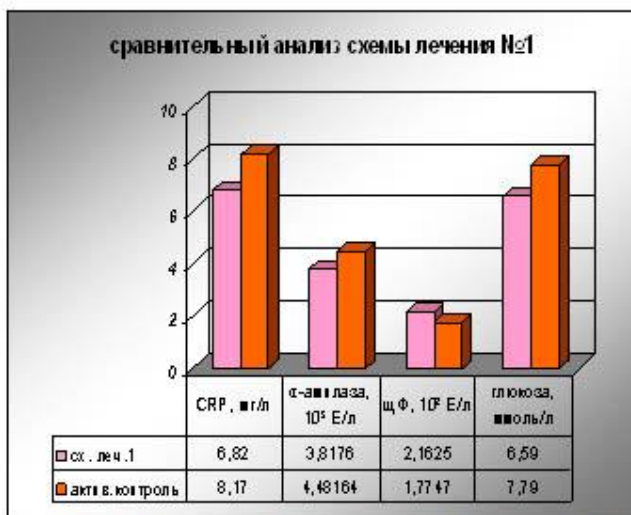


Рис.5 Сравнительный анализ схемы лечения №1 и группы активного контроля

Вторая схема лечения дала такой же результат: снижение показателей щелочной фосфатазы, с-реактивного белка и  $\alpha$ -амилазы. Статистически значимые различия также наблюдаются по уровню глюкозы (рис.6).

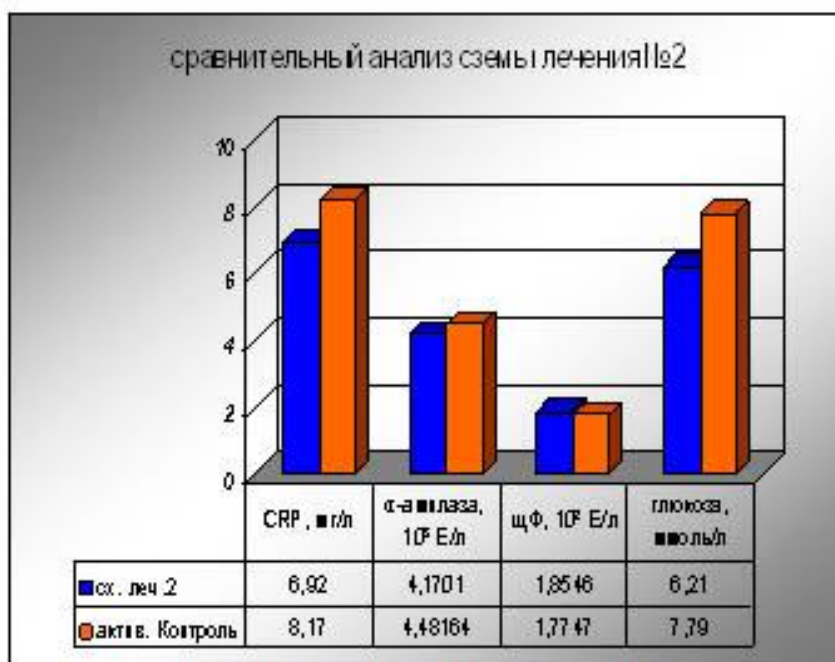


Рис.6 сравнительный анализ схемы лечения №2 и группы активного контроля

Статистических значимых различий между показателями щелочной фосфатазы,  $\alpha$ -амилазы и глюкозы при применении традиционной схемы ФДТ и схемы лечения №3 нет ( $p > 0,05$ ). Однако уровень с-реактивного белка при проведении лечения с использованием хлорофиллипта и красного света лазера ближе к показателю здоровых животных, чем при применении ФДТ с метиленовым синим ( $p < 0,05$ ) (рис.7).

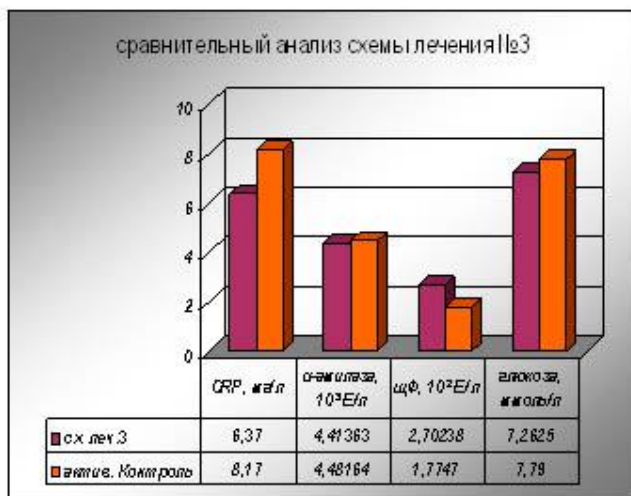


Рис.7. сравнительный анализ схемы лечения №3 и группы активного контроля

При применении схемы №4 отмечается скачок значения с-реактивного белка, который значительно выше как показателей интактных животных, так и леченных ФДТ с метиленовым синим ( $p < 0,05$ ). Уровень щелочной фосфатазы ближе к показателям больных животных, чем к норме и достоверно выше, чем у крыс группы активного контроля ( $p < 0,01$ ). Однако в этой группе достоверно ниже показатель глюкозы, чем в группе активного контроля ( $p < 0,001$ ), и он соответствует значению этого параметра у здоровых животных. Уровень А-амилазы в группах №4 и активного контроля не отличается статистически значимо (рис.8).

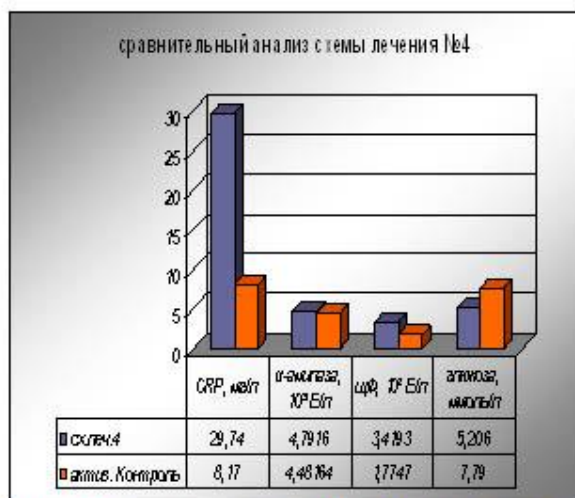


Рис.8. Сравнительный анализ схемы лечения №4 и группы активного контроля.

Выводы: из всего вышеизложенного можно сделать вывод, что схемы лечения с настойкой эвкалипта и с синим светом (схема №1), с раствором хлорофиллипта и синим светом (схема №2) и с раствором хлорофиллипта и красным светом (схема №3) оказывают благотворное воздействие на биохимические параметры крови лабораторных животных, уменьшая проявления системного иммуно-воспалительного ответа организма. Схема с настойкой эвкалипта и красным светом (схема №4), а также традиционная антимикробная фотодинамическая терапия, способствуют временному ухудшению некоторых биохимических параметров. Однако для окончательной рекомендации новых методов в клинику или отказа от каких-то из используемых сегодня в практическом здравоохранении, необходим анализ имеющихся морфологических, гематологических и патофизиологических данных.

## Литература

1. Yong-Hee, P. Chun\*. Biological foundation for periodontitis as a potential risk factor for Atherosclerosis / Yong-Hee P. Chun\* [et al.] // Journal of Periodontal Research. Volume 40, Issue 1. P. 87–95.
2. Юдина, Н. А. Экспериментальное обоснование хронического воспалительного процесса в ротовой полости на развитие ишемической болезни сердца / Н. А. Юдина [и др.] // Медицина. 2008. № 4. С. 78–81.
3. Плавский, В. Ю. Перспективы использования полупроводниковых лазеров и сверхярких светодиодов для антимикробной фотодинамической терапии. Полупроводниковые лазеры и системы на их основе: сб. статей 7-го Белорусско-Российского семинара. 1–5 июня 2009 г. / В. Ю. Плавский [и др.]. Минск: Институт физики НАН Беларуси, 2009. С. 239–242.
4. Плавский, В. Ю. отодинамическая активность лекарственных препаратов на основе экстрактов эвкалипта: материалы науч.-практ. конф. «Лазерная медицина XXI века», 9–10 июня 2009 г. / В. Ю. Плавский [и др.]. М.: ФГУ «Государственный научный центр лазерной медицины», 2009. С. 72.
5. Плавский, В. Ю. Перспективы использования лекарственных препаратов на основе экстрактов эвкалипта и зверобоя в качестве фотосенсибилизаторов для антимикробной фотодинамической терапии: XVII Международная конференция «Лазерно-информационные технологии в медицине, биологии и геоэкологии – 2009», п. Абрау-Дюрсо: тез. докл. / В. Ю. Плавский [и др.]. Новороссийск, 2009