

**АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ
С ПРИМЕНЕНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ
(ИССЛЕДОВАНИЕ *IN VITRO*)**

¹Куцевляк В.Ф., ¹Пушкарь Л.Ю., ¹Северин Л.В., ¹Велигоря И.Е.,
²Войда Ю.В., ²Бирюкова С.В., ³Коробов А.М., ⁴Пономарев Г.В.

¹Харьковская медицинская академия последипломного образования (ХМАПО),
кафедра стоматологии и терапевтической стоматологии,
ул. Тринклера, 6, г. Харьков, 61022, Украина, тел.: +38(057)705-17-55;

²Харьковская медицинская академия последипломного образования (ХМАПО),
Кафедра клинической иммунологии и микробиологии ХМАПО,
ул. Пушкинская, 14, г. Харьков, 61057, Украина, тел.: +38(057)731-19-59;

³Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина,
НИ лаборатория квантовой биологии и квантовой медицины,
майdan Свободы, 4, г. Харьков, 61022, Украина,
e-mail: amkorobov@i.ua; тел.: +38(057)705-51-91

⁴Научно-исследовательский институт биомедицинской химии
имени В.Н.Ореховича РАМН, г. Москва, Россия

Исследован антимикробный эффект воздействия на стандартные культуры E. coli в течение 3 или 5 минут фиолетовым, синим, зеленым или красным излучением светодиодов с мощностью 25 мВт и плотностью мощности 3 мВт/см² после обработки этих культур растворами фотосенсибилизаторов димегина (0,35%), фотодитазина (0,5%) и метиленового синего (1%). Установлено, что воздействие только светом или только фотосенсибилизатором не приводит к подавлению роста культуры E. coli, за исключением 1% раствора метиленового синего, который проявлял самостоятельный антимикробный эффект. Рост E. coli не наблюдался и после воздействия на обработанные метиленовым синим культуры красным, зеленым, синим и фиолетовым светом, что также указывает на бактерицидный эффект самого фотосенсибилизатора.

При использовании димегина наибольший антимикробный эффект дало воздействие фиолетовым светом с экспозицией 5 мин. Сходный результат получен и при воздействии фиолетового света после обработки культуры фотодитазином. Полученные in vitro результаты опытов свидетельствуют о перспективности фотодинамической терапии в качестве антибактериального лечения инфекционно-воспалительных заболеваний полости рта.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, E. coli, димегин, фотодитазин, метиленовый синий, излучение светодиодов.

Введение и цель работы

Видовой состав постоянной микрофлоры полости рта (бактерии, грибки, простейшие, вирусы и др.) в норме довольно стабилен, а представители непостоянной микрофлоры обнаруживаются, как правило, в очень незначительных количествах и в короткие периоды времени. Длительному пребыванию и жизнедеятельности их в полости рта препятствуют местные неспецифические факторы защиты — лизоцим слюны, фагоциты, а также постоянно присутствующие здесь лактобациллы и стрептококки, которые являются ан-

тагонистами многих непостоянных обитателей полости рта. В здоровом организме постоянная микрофлора выполняет функцию биологического барьера, препятствуя размножению патогенных микроорганизмов, поступающих из внешней среды. Она также является постоянным стимулятором местного иммунитета.

При нарушениях физиологического состояния полости рта представители непостоянной микрофлоры могут задерживаться в ней и размножаться. Так, наличие съемных протезов приводит к развитию хронического воспаления под их ба-

зисом с нарушением слюноотделения и орошения слизистой оболочки. В подобных ситуациях резко возрастает колонизация грибами *Candida*, а также бактериями из желудочно-кишечного тракта - эшерихиями (их основной представитель в полости рта — кишечная палочка), энтерококками и др.

Стойкие изменения состава и свойств микрофлоры, обусловленные снижением реактивности организма, резистентности слизистой оболочки полости рта, а также некоторыми лечебными мероприятиями (лучевая терапия, прием антибиотиков, иммуномодуляторов и др.), могут приводить к возникновению различных заболеваний полости рта, возбудителями которых бывают как патогенные микроорганизмы, попадающие извне, так и условно-патогенные представители постоянной микрофлоры ротовой полости.

В связи со снижением эффективности медикаментозной антибактериальной терапии, образованием устойчивых к известным антибиотикам штаммов микроорганизмов, невысокой эффективностью и длительностью сроков общепринятых методов, поиск новых способов лечения инфекционно-воспалительных процессов в полости рта является актуальным. Перспективными считаются физические методы, которые способствуют снижению медикаментозной нагрузки на организм, предотвращают его аллергизацию, развитие токсических, иммуносупрессивных и других побочных эффектов.

Среди современных технологий лечения инфекционных заболеваний важное место принадлежит фотодинамической терапии (ФДТ) - щадящему, относительно безвредному, хорошо переносимому больными методу, позволяющему повторять, при необходимости, лечение многократно [3, 7]. Антимикробная ФДТ основана на использовании веществ-фотосенсибилизаторов (ФС) с последующим воздействием низкоэнергетического излучения лазеров или светодиодов, запускающего фотодинамическую реакцию [1].

ФС - химическое соединение, молекула которого под действием света видимой части спектра переходит в возбужденное состояние, а при возврате в основное состояние передает полученную энергию другим соединениям. В роли ее акцептора выступает кислород, всег-

да присутствующий в биологических тканях. Под действием ФС он переходит в активную синглетную форму. Взаимодействуя с белками и др. макромолекулами, синглетный кислород

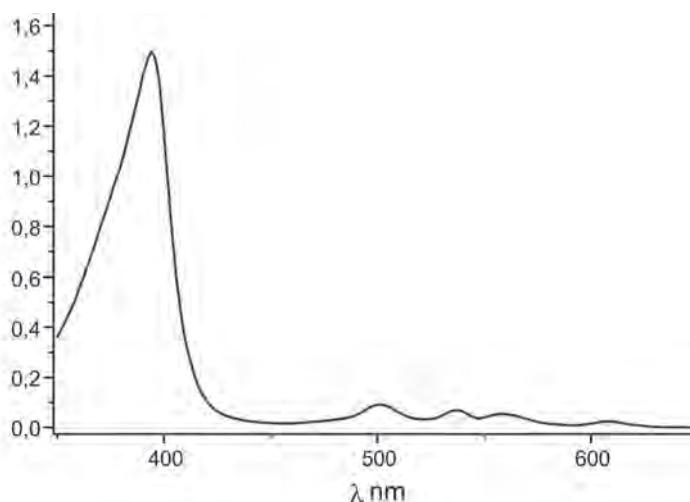


Рис. 1. Спектр поглощения водного раствора димегина (при pH 9.5).

Здесь и на рис. 2, 3: λ - длина волны излучения, нм;
D - интенсивность поглощения.

запускает каскад свободно-радикальных реакций, в результате которых повреждаются биологические структуры, что приводит к некрозу и апоптозу клеток. ФС избирательно накапливается в энергодефицитных клетках (опухолевых, микробных, поврежденных), давая возможность

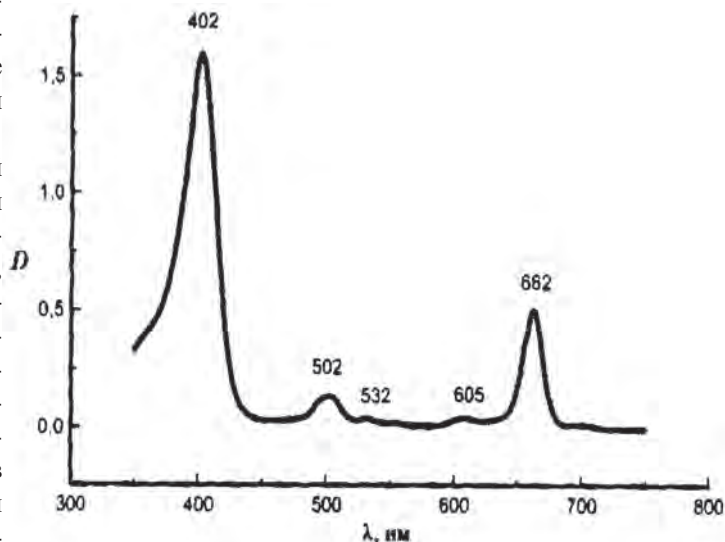


Рис. 2. Спектр поглощения водного раствора фотодитазина.

использовать фотодинамическую реакцию для их уничтожения [4].

Известно также, что ФДТ оказывает выраженный бактерицидный эффект, противовоспалительное действие, усиливает иммунный ответ,

предупреждает дистрофические и склеротические процессы [2, 5, 6, 8].

Целью исследования было изучение *in vitro* антимикробного эффекта в отношении кишечной палочки различных сочетаний ФС (растворов метиленового синего, димегина и фотодитазина) с последующим воздействием низкоэнергетического излучения светодиодов одного из четырех цветов (красного, зеленого, синего и фиолетового).

Материалы и методы исследования

Использованные в опытах три ФС отличаются существенно различными спектрами поглощения света. Главная особенность димегина (рис. 1) заключается в том, что в области длин волн 395-405 нм имеется интенсивная полоса поглощения.

Таким образом, этот ФС можно возбуждать, используя доступные и относительно дешевые светодиодные источники синего и фиолетового излучения (с длиной волны 390-410 нм).

Анализируя спектр поглощения фотодитазина (рис. 2), можно заметить, что у этого ФС пики поглощения имеют место при длинах волн 400 и 660 нм – в сине-фиолетовой и в красной части видимого спектра. Это открывает возможность использования фотодитазина для проведения не только ФДТ, но и фотодинамической диагностики.

Спектр поглощения 1% водного раствора метиленового синего (рис. 3) имеет максимум поглощения в красной области спектра (длины волн от 650 до 670 нм). Интенсивность поглощения света метиленовым синим здесь выше, чем у дру-

Таблица 1

Результаты контрольных опытов

Контроль	Повторность (засеваемый объем, мл)	Количество выросших колоний	Среднее значение КОЕ в 1 мл
К1	№1 (0,05)	120	4,23 x 10 ⁷
	№2 (0,05)	104	
	№3 (0,005)	41	
К2 димегин	№1 (0,05)	124	3,24 x 10 ⁷
	№2 (0,05)	112	
	№3 (0,005)	25	
К2 фотодитазин	№1 (0,05)	128	4,95 x 10 ⁷
	№2 (0,05)	195	
	№3 (0,005)	42	
К2 метиленовый синий	№1 (0,05)	1	2 x 10 ⁵
	№2 (0,05)	1	
	№3 (0,005)	0	
К3 красный свет	№1 (0,05)	136	3,54 x 10 ⁷
	№2 (0,05)	55	
	№3 (0,005)	34	
К3 зеленый свет	№1 (0,05)	132	4,25 x 10 ⁷
	№2 (0,05)	156	
	№3 (0,005)	35	
К3 фиолетовый свет	№1 (0,05)	164	5,4 x 10 ⁷
	№2 (0,05)	167	
	№3 (0,005)	48	
К3 синий свет	№1 (0,05)	101	2,74 x 10 ⁷
	№2 (0,05)	100	
	№3 (0,005)	21	
К4 красный свет	№1 (0,05)	55	4,73 x 10 ⁷
	№2 (0,05)	124	
	№3 (0,005)	53	
К4 зеленый свет	№1 (0,05)	126	3,25 x 10 ⁷
	№2 (0,05)	121	
	№3 (0,005)	24	
К4 фиолетовый свет	№1 (0,05)	131	4,2 x 10 ⁷
	№2 (0,05)	79	
	№3 (0,005)	42	
К4 синий свет	№1 (0,05)	93	4,47 x 10 ⁷
	№2 (0,05)	127	
	№3 (0,005)	45	

гих ФС, поэтому можно ожидать выраженного противомикробного эффекта ФДТ с применением красного излучения.

При проведении экспериментов *in vitro* из суточной культуры *E. coli* (ATCC 25922, получен из института Громашевского), выращенной на агаре Мюллера-Хинтона, делали одномиллиардную взвесь в физиологическом растворе, по стандарту мутности разводили до 10^{-4} (рабочее разведение).

Для удобства визуального подсчета осуществлялся засев опытных и контрольных чашек калиброванной петлей (засеваемый объем = 0,005 мл) или пипеткой (засеваемый объем = 0,05 мл в двух повторностях) поскольку изначально была известна степень засеваемой культуры на чашках, а ее точное количество только предполагалось. После этого на поверхность питательной среды наносили раствор одного из трех ФС в объеме 0,1 л, покрывая им всю поверхность чашки. В экспериментах использовали 1% водный раствор метиленового синего (N,N,N',N'-тетраметилтионина хлорид тригидрат, 3,7-бисдиметиламинофенолтиоцианит хлорид), 0,35% раствор димегина (2,4-ди(1-метоксиэтил)-дейтеропорфирина IXдинатриевая соль), 0,5% раствор фотодитазина (N-диметилглюкаминавая

Все чашки облучались на таком расстоянии (1 см для синего, фиолетового, зеленого источников

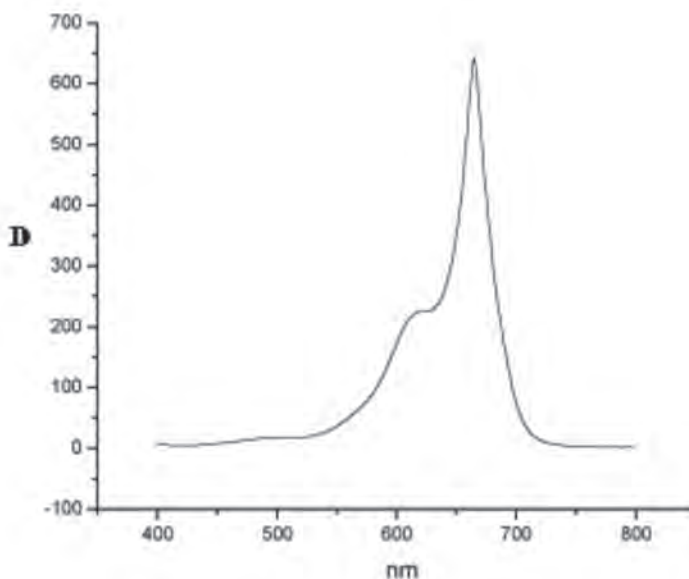


Рис. 3. Спектр поглощения раствора метиленового синего.

светом и 7 см для красного), чтобы достигалась равномерность облучения поверхности засеянной питательной среды. После облучения засеянные чашки инкубировались в термостат при температуре 37°C на 18-24 часа.

В экспериментах использовали излучение светодиодов одного из 4 цветов: красного (длина

Таблица 2

Результаты сочетанного воздействия димегина и излучения различного цвета на культуру *E.coli*.

Цвет излучения светодиодов	Экспозиция, мин.			
	3		5	
	Количество выросших колоний (засеваемый объем, мл)	Среднее значение КОЕ в 1 мл	Количество выросших колоний (засеваемый объем, мл)	Среднее значение КОЕ в 1 мл
Красный	85 (0,05)	3,57 x 10 ⁷	135 (0,05)	5,42 x 10 ⁷
	120 (0,05)		198 (0,05)	
	33 (0,005)		48 (0,005)	
Зеленый	75 (0,05)	3,07 x 10 ⁷	56 (0,05)	1,75 x 10 ⁷
	106 (0,05)		43 (0,05)	
	28 (0,005)		11 (0,005)	
Фиолетовый	63 (0,05)	7,2 x 10 ⁶	7 (0,05)	3,8 x 10 ⁶
	35 (0,05)		0 (0,05)	
	1 (0,005)		5 (0,005)	
Синий	106 (0,05)	3,4 x 10 ⁷	96 (0,05)	2,6 x 10 ⁷
	154 (0,05)		94 (0,05)	
	25 (0,005)		20 (0,005)	

соль хлорина Е6, ООО «Вета-Гранд»). Перед воздействием света чашки выдерживались в темноте в течение 20 мин., облучение проводилось в темной комнате, куда не попадали солнечные лучи.

волны 635-660 нм, аппарат Лика-терапевт, ЧМПШ «Фотоника Плюс», г.Черкассы), а также зеленого (500-565 нм), синего (440-485 нм) и фиолетового (380-440 нм, аппарат А.М.Коробова, г.Харьков)

Результаты сочетанного воздействия фотодитазина и излучения различного цвета на культуру *E. Coli*.

Цвет излучения светодиодов	Экспозиция, мин.			
	3		5	
	Количество выросших колоний (засеваемый объем, мл)	Среднее значение КОЕ в 1 мл	Количество выросших колоний (засеваемый объем, мл)	Среднее значение КОЕ в 1 мл
Красный	129 (0,05)	2,85 x 10 ⁷	63 (0,05)	2,85 x 10 ⁷
	158 (0,05)		65 (0,05)	
	14 (0,005)		30 (0,005)	
Зеленый	178 (0,05)	4,8 x 10 ⁷	59 (0,05)	2,3 x 10 ⁷
	182 (0,05)		126 (0,05)	
	36 (0,005)		16 (0,005)	
Фиолетовый	59 (0,05)	2,33 x 10 ⁷	64 (0,05)	9,2 x 10 ⁶
	121 (0,05)		44 (0,05)	
	17 (0,005)		3 (0,005)	
Синий	152 (0,05)	3,55 x 10 ⁷	98 (0,05)	2,21 x 10 ⁷
	130 (0,05)		154 (0,05)	
	25 (0,005)		8 (0,005)	

с мощностью 25 мВт, плотностью мощности 3 мВт/см² и экспозициями 3 и 5 мин.

Все эксперименты проводились в трехкратных повторах – см. табл. 1-3. Четыре серии экспериментов были контрольными: К1 – рост *E. coli* без ФС и облучения; К2 – без воздействия светом, но с обработкой одним из трех ФС; К3 – рост *E. coli* без ФС после воздействия излучения одного из четырех цветов в течение 5 мин. и без обработки ФС; К4 – то же, что и в К3, но с экспозицией облучения 3 мин.

В основных сериях опытов изучалась чувствительность *E. coli* к фотодинамическому эффекту сочетания последовательной обработки культур ФС, а затем излучением различных цветов.

Подсчитывалось число выросших в чашках колоний и определялось число колониобразующих единиц (КОЕ) на 1 мл засеянной культуры *E. coli*.

Результаты и их обсуждение

На рис. 4 представлен внешний вид контрольных чашек К1 (два разных засеваемых объема) и К2 (три различных ФС), не подвергавшихся облучению светом.

Количественные данные контрольных экспериментов представлены в табл. 1. Как видно, воздействие на *E. coli* лишь ФС либо только светом не приводит к желаемому эффекту – снижению числа выросших колоний. Исключение составляет 1% во-

дный раствор метиленового синего, который обладает самостоятельной антимикробной активностью, но рассматриваемый в данном исследовании не как

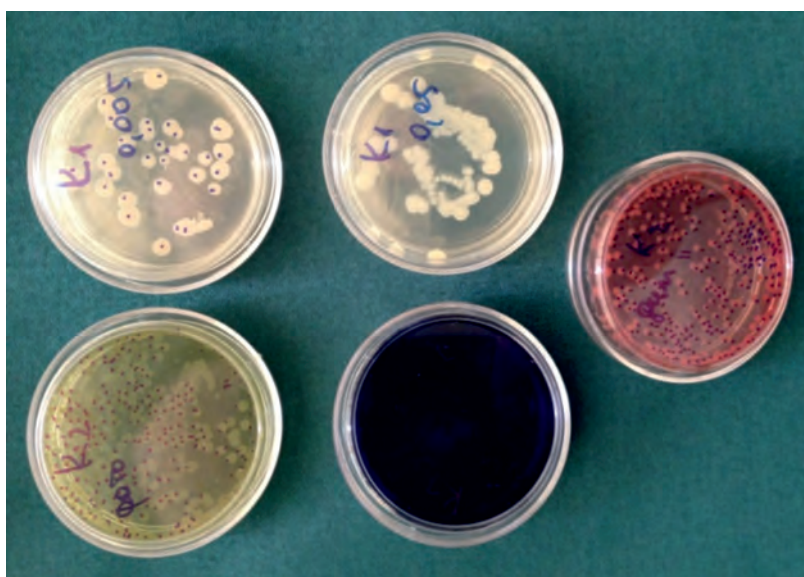


Рис. 4. Контрольные чашки (серии К1 и К2).

антибактериальное средство, а как фотосенсибилизатор для проведения фотодинамической терапии.

В основной серии опытов, где изучалось антимикробное действие димегина на культуру *E. coli* в сочетании с последующим воздействием излучения разных цветов, было получено (табл. 2), что с точки зрения подавления роста колоний наиболее эффективно использование фиолетового света (рис. 5), что соответствует вышеприведенным данным о максимуме поглощения данного ФС именно в этой области длин волн (см. рис. 1).

По результатам основной серии опытов, где изучался антимикробный эффект сочетания фо-

тодитазина и облучения с разной длиной волны (табл. 3), также оказалось, что для подавления роста культуры *E. Coli* наиболее эффективен фиолетовый свет (рис. 6), хотя и в меньшей степени.

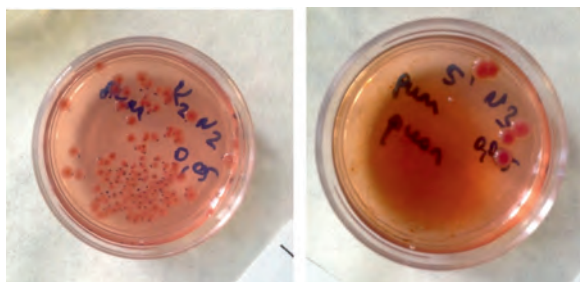


Рис. 5. Разное количество выросших колоний в необлученном контроле K2 (слева) и в опыте с использованием димегина и фиолетового света при экспозиции 5 мин. (справа)

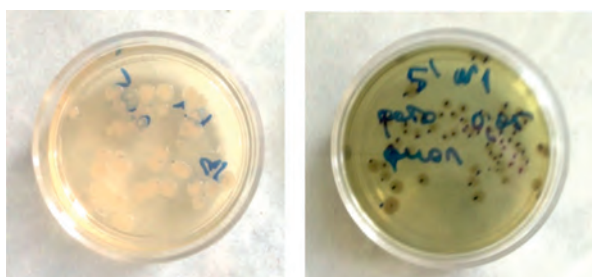


Рис. 6. Разное количество выросших колоний в необлученном контроле K2 (слева) и в опыте с использованием фотодитазина и фиолетового света при экспозиции 5 минут (справа).

В опытных чашках с метиленовым синим роста колоний через 24 часа не наблюдалось. Только через 48 часов наблюдались точечные единичные колонии в одном из трех вариантов при воздействии фиолетового и синего света (рис. 7).

При выбранных экспозициях дозозависимости фотодинамической терапии не наблюдалось.



Рис. 7. Результаты опыта с метиленовым синим. Точечные колонии.

В дальнейших исследованиях предполагается изменение времени и концентрации раствора метиленового синего.

Выводы

Само по себе воздействие светового излучения не приводит к подавлению роста культуры *E. Coli*. Из трех испытанных ФС самостоятельный антимикробный эффект проявил только 1% водный раствор метиленового синего ($K1 = 4,23 \times 10^7$, $K2_{мс} = 2 \times 10^5$ КОЕ/мл). После воздействия на обработанные метиленовым синим культуры красным, зеленым, синим и фиолетовым светом с мощностью 25 мВт в течение 5 минут рост *E. Coli* не наблюдался, что также свидетельствует о бактерицидном эффекте самого ФС.

При использовании димегина как ФС наибольший антимикробный эффект дало воздействие фиолетовым светом с экспозицией 5 минут. Сходный результат получен и при воздействии фиолетового света после обработки культуры фотодитазином.

Полученные *in vitro* результаты опытов свидетельствуют о перспективности ФДТ в качестве антибактериального лечения инфекционно-воспалительных заболеваний полости рта.

Література

1. Бургунский В.Г. Теоретические и практические аспекты применения лазеров в стоматологии // Современная стоматология.- 2007.- №1.- С.10-15.
2. Карандашов В.И. Фототерапия. Под редакцией академика Н.Р.Палева / В.И.Карандашов, Е.Б.Петухов, В.С.Зродников.- М.: Медицина, 2001.- 389 с.
3. Миронов А.Ф. Фотодинамическая терапия рака — новый эффективный метод диагностики и лечения злокачественных опухолей // Соросовский образовательный журнал.- 1999.- №6.- С.32-40.
4. Наумович С.А. Новое в лечении заболеваний периодонта: фотодинамическая терапия / С.А.Наумович, В.Ю.Плавский, П.Т.Петров, А.В.Кувшинов // Современная стоматология.- 2007.- №2.- С.27-29.
5. Соколов В.В. Фотодинамическая терапия. Возможности и перспективы // Международный конгресс «Лазер и здоровье 99».- М., 1999.- С.413-414.
6. Странадко Е.Ф. Роль фотодинамической терапии в хирургии //Материалы научно-практической конференции с международным участием, посвященной 20-летию ФГУ «ГНЦ лазерной медицина Росздрава».- М., 2006.- С.157-158.
7. Толстых П.И. Фотодинамическая и NO-терапия гнойных ран / П.И.Толстых, В.А.Дербенев, А.И.Гусейнов и др. //Лазерная медицина.- 2004.- Т.8, №3.- С.15-27.
8. Komerik N. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model / N.Komerik, H.Nakanishi, A.J.MacRobert et al. // Antimicrob. Agents Chemother.- 2003.- Vol.47.- P.932-940.

**АНТИБАКТЕРІАЛЬНА АКТИВНІСТЬ ФОТОДИНАМІЧНОЇ ТЕРАПІЇ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ
РІЗНИХ ФОТОСЕНСИБІЛІЗАТОРІВ (ДОСЛІДЖЕННЯ IN VITRO)**

¹Куцевляк В.Ф., ¹Пушкар Л.Ю., ¹Северин Л.В., ¹Велигоря І.Є.,
²Войда Ю.В., ²Бірюкова С.В., ³Коробов А.М., ⁴Пономарьов Г.В.,
¹Харківська медична академія післядипломної освіти (ХМАПО),
кафедра стоматології та терапевтичної стоматології,
вул. Трінклера, 6, м Харків, Україна, тел.: +38(057)705-17-55;
²Харківська медична академія післядипломної освіти (ХМАПО),
Кафедра клінічної імунології та мікробіології ХМАПО,
вул. Пушкінська, 14, м Харків, Україна, тел.: +38(057)731-19-59;
³Харківський національний університет ім. В.Н.Каразіна,
лабораторія квантової біології та квантової медицини,
майдан Свободи, 4, м Харків, 61022, Україна,
e-mail: amkorobov@i.ua; тел.: +38(057)705-51-91
⁴Науково-дослідний інститут біомедичної хімії
імені В.Н.Ореховіча РАМН, м. Москва, Росія

Досліджено антимікробний ефект впливу на стандартні культури *E. coli* протягом 3 або 5 хвилин фіолетовим, синім, зеленим або червоним випромінюванням світлодіодів з потужністю 25 мВт і щільністю потужності 3 мВт/см² після обробки цих культур розчинами фотосенсибілізаторів дімегіна (0,35%), фотодітазину (0,5%) і метиленового синього (1%).

Встановлено, що вплив тільки світлом або тільки фотосенсибілізатором не приводить до пригнічення росту культури *E. coli*, за винятком 1% розчину метиленового синього, який виявляв самостійний антимікробний ефект. Зростання *E. coli* не спостерігається і після впливу на оброблені метиленовим синім культури червоним, зеленим, синім і фіолетовим світлом, що також вказує на бактерицидний ефект самого фотосенсибілізатора.

При використанні дімегіна найбільший антимікробний ефект дало вплив фіолетовим світлом з експозицією 5 хв. Подібний результат отримано і при дії фіолетового світла після обробки культури фотодітазином. Отримані *in vitro* результати дослідів свідчать про перспективність фотодинамічної терапії в якості антибактеріального лікування інфекційно-запальних захворювань порожнини рота.

Ключові слова: фотодинамічна терапія, *E. coli*, дімегін, фотодітазін, метиленовий синій, випромінювання світлодіодів.

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF PHOTODYNAMIC THERAPY USING VARIOUS
PHOTOSENSITIZERS (STUDY IN VITRO)**

¹Kutsevlyak V.F., ¹Pushkar L.Y., ¹Severin L.V., ¹Veligorya I.E.,
²Voیدا Yu.V., ²Biryukova S.V., ³Korobov A.M., ⁴Ponomarev G.V.
¹Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education (KhMAPE)
Department of dentistry and restorative dentistry,
st. Trinklera, 6, Kharkov, Ukraine, tel. +38(057)705-17-55;
²Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education (KhMAPE),
Department of Clinical Immunology and Microbiology KhMAPE,
st. Pushkinskaya, 14, Kharkov, Ukraine Tel. : +38(057)731-19-59;
³Kharkiv National University. V.N.Karazin,
Laboratory of quantum biology and quantum medicine,
Svobody sq., 4, Kharkov, 61022, Ukraine,
e-mail: amkorobov@i.ua; tel.: +38(057)705-51-91
⁴V.N.Orehovych Scientific and Research Institute
of Biomedical Chemistry RAMS, Moscow, Russia

We investigated the effect on the antimicrobial standard *E. coli* culture for 3 or 5 minutes, violet, blue, green or red LED radiation with a power of 25 mW and a power density of 3 mW/cm² after the treatment of these crops with solutions of photosensitizers dimegina (0.35%) Photoditazin (0.5%) and methylene blue

(1%). It is found that the effect of light only, or the photosensitizer alone does not suppress the growth of culture E. coli, except for a 1% solution of methylene blue which showed independent antimicrobial effect. Growth of E. coli was observed after exposure to methylene blue-treated culture of red, green, blue and violet light, which also points to the bactericidal effect of the photosensitizer.

When using dimegina greatest antimicrobial effect given the impact of violet light with an exposure of 5 minutes. A similar result was obtained when exposed to violet light after treatment photodithazine culture. The in vitro results of experiments indicate the prospects of photodynamic therapy as an antibacterial treatment of infectious and inflammatory diseases of the oral cavity.

Keywords: *photodynamic therapy, E. coli, dimegin, photodithazine, methylene blue, LED lights.*