

УДК 616+615-001.27

Гертман В.З., Пушкарь Е.С., Пономаренко С.В.

РАЗРАБОТКА ПАРАМЕТРОВ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ФОТОДИНАМИЧНОЙ ТЕРАПИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СВЕТА В ОПТИЧЕСКОМ ДИАПАЗОНЕ И ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО

ГУ «Институт медицинской радиологии им. С.П. Григорьева Национальной академии медицинских наук Украины», г. Харьков

ГУ «Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова Национальной академии медицинских наук Украины», г. Харьков

Проведены исследования *in vitro* по разработке эффективной схемы антибактериальной фотодинамической терапии (ФДТ) для лечения инфицированных локальных радиационно-индуцированных повреждений кожи. Целью работы является подбор оптимальной концентрации, времени экспозиции выбранного фотосенсибилизатора (метиленового синего) и параметров экспозиции облучения с помощью светодиодного (LED) красного света (λ - 630-650 нм) для проведения антибактериальной ФДТ. Исследования проводились *in vitro* на культурах *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* в чашках Петри. В качестве фотосенсибилизатора использовался водный раствор красителя метиленового синего в виде аппликаций 0,1% и 0,05% раствора. Источником светодиодного излучения служил фотонный аппарат «БАРВА-LED / 630». Установлено, что отдельные компоненты ФДТ - фотосенсибилизатор метиленовый синий и светодиодное излучение - не оказывали заметного антимикробного действия. При сочетании выбранных оптимальных параметров фотосенсибилизатора (0,1% водный раствор метиленового синего) и фотодиодного излучения (λ - 630-650 нм, 45 Дж / см²), т.е. при фотодинамическом действии, происходила гибель 99,8-99,98 % микробных клеток тест-штаммов *S. aureus* и *P. aeruginosa*. Полученные результаты позволяют рекомендовать данную схему антибактериальной ФДТ для проведения исследований *in vivo*.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, метиленовый синий, фотодиодное излучение, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Робота виконувалась в рамках планової науково-дослідницької роботи «Вивчення ефективності фотодинамічної терапії для лікування інфікованих променевих ушкоджень шкіри», № гос. реєстрації 0114U000058.

В незаживающих язвах различного генеза, а тем более на поверхности лучевых язв, довольно редко встречается бактериальная монокультура, обычно микробный пейзаж представлен полимикробным обсеменением [2]. По данным ряда авторов, в долго незаживающих язвах, в том числе лучевого генеза, чаще всего встречаются ассоциации из 2-3-х видов микробов, при этом лидирующее положение среди микрофлоры занимают *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* [2,4].

Известно, что традиционным методом лечения инфицированных лучевых язв является антибиотикотерапия. Однако, подобное лечение значительно усложняется развитием резистентности микробов к антибиотикам. На этом фоне в последнее десятилетие стало активно развиваться направление с использованием альтернативных немедикаментозных методов лечения инфицированных ран и язв. В этом плане одним из перспективных направлений в медицине является фототерапия, в частности, фотодинамическая терапия (ФДТ).

ФДТ является светозависимой методологией и включает в себя два основных компонента – световое излучение различных длин волн в оптическом диапазоне и фотосенсибилизатор (ФС), способный накапливаться в клетках-мишенях [7].

Главное назначение фотосенсибилизатора – это способность поглощать падающую энергию направленного светового потока с развитием фотохимической реакции и передачей образо-

вавшейся энергии возбуждения присутствующему в тканях молекулярному кислороду, что приводит к образованию большого количества активных форм кислорода (АФК), прежде всего синглетного кислорода (¹O₂) и супероксид анион радикала кислорода (O₂⁻ •). Последние запускают целую цепь окислительных процессов, которые приводят к гибели клеток-мишеней посредством апоптоза или некроза [7].

Метод ФДТ широко применяется в онкологии, хирургии и других областях медицины. Одним из новых направлений в использовании ФДТ является лечение инфицированных дефектов кожи и мягких тканей [6,8]. Для этих целей применяются различные виды фотосенсибилизаторов.

Фотосенсибилизатор – это особое вещество, способное селективно накапливаться в целевых клетках и впоследствии активно воздействовать на них под влиянием видимого света с длиной волны, соответствующей максимуму поглощения конкретного ФС. Для ФДТ разработано большое количество ФС с различными путями введения в организм: энтеральный, парентеральный, ингаляционный, аппликационный [8].

Для лечения ран и поверхностных повреждений кожи и мягких тканей чаще всего используют аппликационное введение ФС. В этом плане фотосенсибилизирующими свойствами обладают некоторые красители (метиленовый синий, бриллиантовый зеленый, генциан-виолет), фитопрепараты (хлорофиллипт, новоиманин) [1, 5].

Цель работы

Подбор оптимальной концентрации, времени экспозиции избранного фотосенсибилизатора (метиленового синего) и параметров экспозиции облучения светодиодным красным светом ($\lambda = 630-650$ нм) для проведения антибактериальной фотодинамической терапии.

Материал и методы исследования

Исследования проводились *in vitro* на суточных микробных культурах *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* в чашках Петри диаметром 35 мм с питательным агаром. Использовались референтные штаммы *S. aureus* ATCC 25923 и *P. aeruginosa* ATCC 27853, полученные из Музея живых микроорганизмов ГУ «ИМИ НАМН».

Микробная нагрузка на одну чашку Петри составляла $3 \cdot 10^7$ или $3 \cdot 10^6$ микробных клеток стафилококка или синегнойной палочки соответственно. Число живых микроорганизмов определяли методом серийных разведений с последующим высевом на соответствующие питательные среды (для стафилококка маннит-солевой агар, для синегнойной палочки – питательный агар) [3]. Посевы культивировали в течение 18 часов при температуре 37°C . Идентификацию тест-штаммов проводили по морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам. Концентрацию микроорганизмов определяли путем подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ) с учетом разведения исследуемого материала. Для удобства полученные результаты выражали в десятичных логарифмах количества микроорганизмов в 1 мл – lg КОЕ/мл.

В качестве ФС использовался водный раствор красителя метиленового синего

(Methylenum coeruleum – $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) в виде аппликаций 0,1 и 0,05 % растворов. При подборе наиболее эффективной концентрации ФС исследования проводили для каждого вида бактерий. На поверхность, засеянную соответствующим видом микроорганизма, наносили салфетку, смоченную 0,1 или 0,05 % раствором метиленового синего. Экспозиция ФС составляла 30 мин.

Источником немонахроматического светодиодного красного излучения служил фотонный аппарат «БАРВА-LED/630». Условия светового воздействия были следующими:

- длина волны – 630–650 нм;
- мощность красного излучения – 25 мВт;
- плотность мощности на поверхности – 3 мВт/см²;
- плотность энергии за сеанс – 45 Дж/см²;
- экспозиция света – 20, 30 и 60 мин.

Контролем служил показатель роста тест-штаммов, которые не подвергались какому-либо воздействию, а содержались в условиях фонового освещения в течение 60 мин.

Опыты проводили в трех повторах. Статистическую обработку полученных результатов проводили общепринятыми методами статистики с помощью пакета программ STATISTICA. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Для выяснения оптимальных параметров избранного варианта фотодинамической терапии на первом этапе работы было проведено исследование противомикробной активности ФС метиленового синего в зависимости от его концентрации. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1
Изменение количества жизнеспособных бактерий под действием фотосенсибилизатора метиленового синего в разных концентрациях при экспозиции 30 мин

Вид бактерий	Концентрация ФС	Среднее количество бактерий, (M ± m), lg КОЕ/мл	
		Опыт	Контроль
<i>S. aureus</i>	0,1 %	7,28 ± 0,19	7,31 ± 0,15
<i>S. aureus</i>	0,05 %	7,30 ± 0,11	
<i>P. aeruginosa</i>	0,1 %	7,29 ± 0,13	7,33 ± 0,06
<i>P. aeruginosa</i>	0,05 %	7,32 ± 0,17	

Таблица 2
Изменение количества жизнеспособных бактерий под действием светодиодного красного излучения (диапазон длин волн от 630 до 650 нм)

Вид бактерий	Контроль	Среднее количество бактерий, (M ± m), lg КОЕ/мл		
		Опыт, время облучения, минуты		
		20	30	60
<i>S. aureus</i>	7,52 ± 0,14	7,51 ± 0,16	7,49 ± 0,15	7,49 ± 0,18
<i>P. aeruginosa</i>	7,27 ± 0,08	7,28 ± 0,13	7,22 ± 0,11	7,21 ± 0,16

Анализ полученных данных показал, что 0,1 % и 0,05 % растворы метиленового синего не понижали значимо количество жизнеспособных клеток бактерий, то есть сам по себе ФС не обладал противомикробным эффектом. Так, независимо от концентрации ФС, выживаемость микробных клеток сохранялась на уровне 90–100 % (проценты считали от числа абсолютного

количества бактерий).

Во второй серии экспериментов были проведены исследования по выяснению противомикробной активности сверх ярких светодиодов в оптическом диапазоне при длине волны 630–650 нм. Чашки Петри, засеянные тест-штаммами, облучали потоком света при разной экспозиции – 20, 30 и 60 мин. Результаты ис-

следования представлены в таблице 2.

Анализ результатов действия светодиодного красного излучения продемонстрировал его незначительное влияние на жизнеспособность как *S. aureus*, так и *P. Aeruginosa* (табл. 2). Так, освещение в течение 20 мин практически не уменьшало количество *S. aureus* и *P. aeruginosa*, микробы сохраняли способность к размножению в 98–100 % случаев. При освещении с экспозицией 30 мин наблюдалась тенденция к снижению количества выживших микробов (относительно контроля), особенно в культуре *P. aeruginosa* (на 20 %, $p > 0,05$). При экспозиции света 60 мин количество живых бактерий *S. aureus* оставалось на том же уровне (94 %), как и при предыдущей экспозиции. При 60-минутном световом облучении культуры *P. aeruginosa* наблюдалось недостоверное увеличение гибели микробов на 22 % ($p > 0,05$).

Выявленную тенденцию к снижению количества жизнеспособных клеток очевидно можно

связать с наличием в клетках микроорганизмов эндогенных фотосенсибилизаторов с максимумом поглощения красного света, которые относятся к классу порфиринов. Это может объяснить факты восприимчивости микроорганизмов к действию некоторых видов излучения [7].

Эксперименты, проводившиеся на следующем этапе работы, были направлены на выяснение наибольшей антимикробной эффективности плотности световой энергии на поверхности 10 см^2 за сеанс при экспозициях 20, 30 и 60 мин. При этом определение данного параметра светового излучения проводили совместно с ФС метиленовым синим, чтобы оценить значимость длительности световой экспозиции для антимикробного эффекта. Использовали водный раствор фотосенсибилизатора метиленового синего в 0,1 % концентрации при его экспозиции 30 мин. Полученные данные приведены в таблице 3.

Таблица 3
Выбор оптимальной плотности энергии светового излучения при его разных экспозициях по показателям количества жизнеспособных микробов (мощность 25 мВт/см^2)

Вид бактерий	Концентрация ФС	Время действия ФС, мин	Экспозиция светового излучения мин	Плотность энергии светового излучения, Дж/см ²	Среднее количество выживших бактерий (M ± m), lg КОЕ/мл
<i>S. aureus</i>	0,1 %	30	20	30 Дж/см ²	6,11 ± 0,15*
<i>S. aureus</i>	0,1 %	30	30	45 Дж/см ²	4,98 ± 0,23*
<i>S. aureus</i>	0,1 %	30	60	90 Дж/см ²	4,12 ± 0,17*
<i>S. aureus</i> Контроль	0	0	0	0	7,53 ± 0,17
<i>P. aeruginosa</i>	0,1 %	30	20	30 Дж/см ²	5,07 ± 0,31*
<i>P. aeruginosa</i>	0,1 %	30	30	45 Дж/см ²	5,08 ± 0,24*
<i>P. aeruginosa</i>	0,1 %	30	60	90 Дж/см ²	4,98 ± 0,26*
<i>P. aeruginosa</i> Контроль	0	0	0	0	7,12 ± 0,07

Примечание: * – разница достоверна по отношению к контролю, $p < 0,05$.

Продемонстрированные в табл. 3 результаты свидетельствуют о том, что фоновое излучение (контроль) не вызывает гибели микробных клеток. При обработке исследуемых микроорганизмов 0,1 % раствором метиленового синего уже при экспозиции светового излучения 20 мин с плотностью энергии на поверхности за сеанс 30 Дж/см² происходила гибель 98 % микробных клеток стафилококка и 99,4 % синегнойной палочки ($p < 0,05$).

При увеличении экспозиции освещения до 30 мин и повышении плотности энергии на поверхности до 45 Дж/см² происходила значительная элиминация бактерий *S. aureus* – количество жизнеспособных клеток составляло всего 0,2 – 0,02 % относительно контроля ($p < 0,05$). Примерно такие же показатели наблюдались при анализе результатов действия ФДТ на тест-штаммы *P. aeruginosa*.

При увеличении времени воздействия до 60 мин (плотность энергии на поверхности 90 Дж/см²) наблюдалась тенденция к усилению антимикробного эффекта.

Выводы и перспективы дальнейших исследований

При действии на микробные клетки отдельных составляющих комплекса фотодинамической терапии (фотосенсибилизатор метиленовый синий и облучение сверхяркими светодиодами в красном участке оптического спектра) не выявлено достоверного снижения количества жизнеспособных клеток относительно контроля.

Обработка микроорганизмов фотосенсибилизатором с последующим светодиодным облучением, то есть воздействие на микроорганизмы ФДТ, оказывало выраженный противомикробный эффект как на грамположительные (стафилококки), так и на грам-отрицательные бактерии.

С увеличением плотности энергии светового излучения при проведении ФДТ противомикробный эффект возрастает.

Последовательное использование фотосенсибилизатора (0,1 % водного раствора метиленового синего) и монохроматического светодиодного излучения (длина волны 630 – 650 нм, экспозиция 30 мин) вызывает гибель 99,8–99,98 % микробных клеток тест-штаммов *S. aureus* и *P. aeruginosa*.

На основании проведенных *in vitro* экспериментов подобраны оптимальные параметры концентрации и экспозиции фотосенсибилизатора, а также дозы плотности поверхностной энергии излучения, что обусловило выбор этих компонентов ФДТ для проведения дальнейших исследований *in vivo* в терапии инфицированных локальных радиационно-индуцированных повреждений кожи.

Литература

1. Садыков Р.А. Возможности метиленовой сини в фотодинамической инактивации антибиотикорезистентных штаммов бактерий / Р.А. Садыков, Л.В. Баженова, К.Р. Касимова, Р.Р. Садыков // Фотобиология та фотомедицина. – 2011. – № 1. – С. 84–87.
2. Гайдунь К.В. Раневая инфекция. Этиология, диагностика и антимикробная терапия. Краткое информационное пособие для практических врачей / К.В. Гайдунь, А.А. Муконин. - Новосибирск : ООО «АБОЛмед», 2005. – 31 с.

3. Лабинская А.С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований / А.С. Лабинская, А.П. Блинова, А.С. Ещина. – М. : Медицина, 2004. – 576 с.
4. Медицинские средства профилактики и терапии радиационных поражений. Учебное пособие / А.Н. Гребенюк, В.И. Легеза, В.Б. Назаров, А.А. Томашевский. – СПб. : ООО Издательство ФОЛИАНТ, 2011. – 92 с.
5. Плавский В.Ю. Первичный отбор фотосенсибилизаторов для антимикробной фотодинамической терапии из экстрактов и настоек лекарственных растений / В.Ю. Плавский, Л.Г. Плавская, А.И. Третьякова [и др.] // Лазерно-информационные технологии в медицине, биологии и геоэкологии–2010: труды XVIII междунар. конф. 7–11 сентября 2010 г., п. Абрау-Дюрсо, г. Новороссийск, Краснодарский край. – Новороссийск, 2010. – С. 24–25.
6. Странадко Е.Ф. Фотодинамическая терапия гнойно-воспалительных заболеваний мягких тканей / Е.Ф. Странадко // Фотобиология та фотомедицина. – 2011. – № 2. – С. 14–19.
7. Узденский А.Б. Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии / А.Б. Узденский. – М. : Наука, 2010. – 321 с.
8. Jori G. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications / G. Jori, C. Fabris, M. Soncin [et al.] // Lasers Surg Med. – 2006. – Vol. 38 (5). – P. 468–481.

Реферат

РОЗРОБКА ПАРАМЕТРІВ АНТИБАКТЕРІАЛЬНОЇ ФОТОДИНАМІЧНОЇ ТЕРАПІЇ З ВИКОРИСТАННЯМ СВІТЛА В ОПТИЧНОМУ ДІАПАЗОНІ І ФОТОСЕНСІБІЛІЗАТОРА МЕТИЛЕНОВОГО СИНЬОГО

Гертман В.З., Пушкар О.С., Пономаренко С.В.

Ключові слова: фотодинамічна терапія, метиленовий синій, фотодіодне випромінювання, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Проведено дослідження *in vitro* з розробки ефективної схеми антибактеріальної фотодинамічної терапії (ФДТ) для лікування інфікованих локальних радіаційно-індукованих пошкоджень шкіри. Метою роботи став підбір оптимальної концентрації, часу експозиції обраного фотосенсибілізатора (метиленового синього) і параметрів експозиції опромінення за допомогою світлодіодного (LED) червоного світла (λ - 630-650 нм) для проведення антибактеріальної ФДТ. Дослідження проводилися *in vitro* на культурах *Staphylococcus aureus* і *Pseudomonas aeruginosa* в чашках Петрі. В якості фотосенсибілізатора використовувався водний розчин барвника метиленового синього у вигляді аплікацій 0,1% і 0,05% розчину. Джерелом світлодіодного випромінювання служив фотонний апарат «BARVA-LED / 630». Встановлено, що окремі компоненти ФДТ - метиленовий синій фотосенсибілізатор і світлодіодне випромінювання - не проявили помітного антимікробного ефекту. Комбінація обраного оптимального фотосенсибілізатора (0,1% водного розчину метиленового синього) і фотодіодного випромінювання (λ - 630-650 нм, 45 Дж / см²), тобто з фотодинамічною дією, привела до знищення 99,8-99,98 % мікробних клітин тест-штамів *S. aureus* і *P. aeruginosa*. Отримані результати дозволяють рекомендувати цю антибактеріальну схему ФДТ для досліджень *in vivo*.

Summary

ELABORATION OF PARAMETERS FOR ANTIBACTERIAL PHOTODYNAMIC THERAPY WITH USING LIGHT IN OPTICAL RANGE AND METHYLENE BLUE PHOTOSENSITIZER

Gertman V. Z., Pushkar O. S., Ponomarenko S. V.

Key words: photodynamic therapy, methylene blue, photodiode radiation, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

This *in vitro* study focuses on the elaboration of effective scheme of antibacterial photodynamic therapy (PDT) to treat infected local radiation-induced skin injuries. The purpose of the work is to select optimal concentration, exposure time of the photosensitizer (methylene blue) and exposure parameters of irradiation with light-emitting diode (LED) red light (λ – 630-650 nm) for antibacterial PDT. The studies were performed *in vitro* on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* germ cultures in the Petri dishes. Methylene blue aqueous solution in the form of 0, 1% and 0, 05% solution applications was used as a photosensitizer. A source of LED radiation was a photon devise “BARVA-LED/630”. It was found that separate components of PDT – methylene blue photosensitizer and LED radiation – did not produce a noticeable antimicrobial effect. The combination of selected optimal photosensitizer (methylene blue 0, 1% aqueous solution) and photodiode radiation (λ – 630-650 nm, 45 J/cm²) with photodynamic action, led to complete elimination of microorganisms (*P. aeruginosa* and *S. aureus*). The obtained results enables to recommend this antibacterial PDT scheme for further *in vivo* studies.