

КОМПЛЕКСНЫЙ АНТИМИКРОБНЫЙ МЕТОД НА ОСНОВЕ ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Цель работы – разработка и оценка in vitro комплексного антимикробного метода на основе фотодинамического воздействия.

*С использованием тест-культур грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa*) показано, что антимикробный эффект фотодинамического воздействия существенно возрастает при применении комбинации фотосенсибилизатора метиленового синего с диметилсульфоксидом и полимиксином.*

Совместное применение метиленового синего, диметилсульфоксида и полимиксина с последующим облучением светом красной области спектра с длиной волны 670 ± 2 нм

□ Оригинальные научные публикации

приводило к резкому снижению количества жизнеспособных грамотрицательных бактерий в эксперименте в 10 000–1 000 000 раз по сравнению с контролем.

Ключевые слова: гнойно-воспалительные заболевания, фотодинамическая терапия, метиленовый синий, полимиксин, диметилсульфоксид, грамотрицательные бактерии.

T. A. Hrachukha

COMPREHENSIVE ANTIMICROBIAL METHOD BASED ON PHOTODYNAMIC TREATMENT

Objective: to create and evaluate in vitro an antibacterial method on the basis of a photodynamic effect.

Studies on gram-negative cultures (Escherichia coli, Klebsiella pneumonia and Pseudomonas aeruginosa) have shown that the antibacterial effect of photodynamic treatment significantly increased with using the combination of photosensitizer methylene blue, dimethylsulfoxide (DMSO) and polymixin.

The combined use of methylene blue, dimethylsulfoxide and polymixin, together under the radiation of a red light frequency 670 ± 2 nm, has highly decreased the number of gram-negative bacteria in 10 000–1 000 000 times compared with the control number.

Key words: pyo-inflammatory diseases, photodynamic therapy, methylene blue, polymyxin, dimethylsulfoxide, gram-negative bacteria.

При лечении гнойно-воспалительных заболеваний основным этиотропным воздействием на воспалительные очаги является противомикробная химиотерапия, включающая антисептику и антибиотикотерапию. В настоящий момент наиболее актуальным является вопрос преодоления устойчивости микроорганизмов к часто используемым в клинической практике препаратам. Решением данной проблемы является поиск дополнительных методов воздействия на возбудителей. Одним из перспективных направлений среди них являются физико-химические методы, в частности антимикробная фотодинамическая терапия (АФДТ). Фотодинамическое воздействие (ФДВ) обладает выраженной бактерицидной активностью, противовоспалительным действием, усиливает иммунный ответ на патогены, предупреждает дистрофические и склеротические процессы в тканях [1, 6].

Принцип АФДТ заключается в избирательной окислительной деструкции структур микроорганизмов при сочетанном воздействии химического соединения – фотосенсибилизатора (ФС) и оптического излучения с длинами волн, соответствующими спектру поглощения ФС. Принцип метода состоит в том, что, при поглощении квантов света молекулы ФС, связанные с микробной клеткой, переходят в фотовозбужденное состояние и передают энергию возбуждения на молекулярный кислород с образованием цитотоксичного синглетного кислорода [3, 5].

В клинической практике применяется ряд фотосенсибилизаторов, различающихся физическими и химическими характеристиками, а также стоимостью. Одним из наиболее эффективных

и доступных препаратов является катионный фотосенсибилизатор метиленовый синий [5, 8].

Локальное использование фотосенсибилизатора и светового воздействия уже само по себе позволяет получать хороший противомикробный эффект. Однако, способность фотосенсибилизатора связываться с микробной клеткой напрямую зависит от ее структурных компонентов, среди которых основным барьером является клеточная стенка, которая защищает клетку от физических и химических воздействий. Она препятствует проникновению молекул фотосенсибилизатора внутрь бактериальной клетки. Решением проблемы является диметилсульфоксид (ДМСО), который повышает проницаемость клеточной стенки. Синтетический препарат ДМСО обладает противовоспалительным и выраженным местнообезболивающим действием, увеличивает чувствительность микрофлоры к антимикробным средствам.

Изучение структурно-функциональных связей между бактериальной клеткой и молекулами фотосенсибилизатора показало, что структуры грамположительных бактерии активно связываются с нейтральными и положительно заряженными молекулами ФС и под действием света фотодинамически повреждаются. Иная картина наблюдается с грамотрицательными бактериями. Молекулы фотосенсибилизатора также связываются с клеточной стенкой, но не инактивируют бактерии при облучении светом. [4, 9] Следовательно, существует необходимость в дополнительном воздействии на эту группу микроорганизмов. Препаратом выбора является антибиотик, обладающий выраженным узким спектром активнос-

ти против грамотрицательной флоры – полимиксин. Механизм его действия обусловлен главным образом блокадой проницаемости цитоплазматической мембраны бактериальных клеток, что приводит к их деструкции [7, 8].

Цель работы. Разработка комплексного антимикробного метода на основе фотодинамического воздействия в отношении грамотрицательных бактерий.

Материалы и методы. В качестве объекта воздействия использовались госпитальные, множественно резистентные к антибиотикам штаммы грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa*, выделенные от пациентов с гнойно-септическими инфекциями.

Инициатором фотодинамической реакции выступал катионный фотосенсибилизатор метиленовый синий в концентрации 20 мг/мл. При ФДВ применяли излучение малогабаритного полупроводникового лазерного терапевтического аппарата «Люзар-МП» производства РБ. Ранее было установлено, что наиболее эффективным в отношении возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний, является излучение волны красной области спектра с длиной 670 ± 2 нм [2]. Исходя из того, что ни фотосенсибилизатору, ни световому облучению по отдельности не свойственны выраженное бактерицидное действие и фотодинамическая реакция возникает только при одновременном действии этих двух факторов, во всех сериях опытов, где применялся ФС метиленовый синий, после 10 минут его экспозиции с культурой проводили облучение светом. [4, 10] Мощность лазерного излучения на выходе излучателя составляла 15 мВт при времени воздействия 5 минут. Расстояние от световодной насадки до поверхности питательной среды составляло 2 см, что давало возможность распределить световой поток равномерно по всей поверхности посева. ДМСО использовали в виде 25 % водного раствора.

Раствор полимиксина готовили путем растворения в стерильной дистиллированной воде до концентрации равной 1/2 минимальной ингибирующей концентрации (МИК) – 0,06 мкг/мл, установленной в серии предварительных опытов.

Суточные агаровые культуры тест-организмов суспендировали в физиологическом растворе и доводили до плотности 10^5 – 10^6 КОЕ/мл. Питательную среду (МПА) в чашках Петри засеивали тест-культурами методом «газона», распределяли суспензию по поверхности питательной среды покачиванием.

В первой серии исследования взвеси тест-культур смешивали с одним из следующих рас-

творов: фотосенсибилизатором, ДМСО, полимиксином.

Во второй серии исследования проводили опыты с двойной комбинацией растворов: ФС метиленовый синий с димексидом, ФС метиленовый синий с полимиксином, димексид с полимиксином.

В третьей серии исследования использовали тройную комбинацию растворов: ФС метиленовый синий с димексидом и полимиксином одновременно.

В качестве контроля использовали посеы интактных тест-культур бактерий *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa*. Контрольные и опытные посеы помещали в термостат с температурой 37 ± 2 °С. Через 24 часа при помощи полуавтоматического счетчика колоний подсчитывали количество колоний (КОЕ/мл) бактерий в опыте и контроле.

Результаты и обсуждение. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием возможностей программы обработки электронных таблиц «Microsoft Excel 2007» и диалоговой системы «Statistika 9.0».

Для анализа полученных данных применялась описательная статистика – представление результатов с помощью различных агрегированных показателей: среднего значения, среднеквадратичного отклонения, коэффициента вариации.

Уровень антимикробной активности считали достаточно высоким при снижении числа выживших бактерий (КОЕ/мл) более чем в 10 000 раз.

В первой серии опытов, оценивая антимикробную активность каждого препарата в отдельности из числа применяемых в комплексном методе, установлено, что ДМСО при его изолированном применении антибактериальной активности в отношении изученных штаммов бактерий не проявляет. При использовании метиленового синего или полимиксина отмечен недостаточно высокий уровень антимикробной активности. Количество жизнеспособных бактерий уменьшилось в 100–1000 (таблица 1, рисунок 1).

Во второй серии опытов, при одновременном воздействии двух препаратов, наблюдается повышение уровня антибактериальной активности, количество жизнеспособных бактерий уменьшилось в 1000–10 000 раз.

В третьей серии опытов, при воздействии тройной комбинации препаратов метиленового синего, димексида и полимиксина с последующим облучением, достигнут наибольший антимикробный эффект, количество жизнеспособных бактерий уменьшилось в 10 000–1 000 000 раз.

С целью повышения наглядности сравнительного анализа однородных показателей, исполь-

Оригинальные научные публикации

Таблица 1. Результаты оценки эффективности комплексного антимикробного метода на основе фотодинамического воздействия в отношении грамотрицательных бактерий

	№ Культур	Контроль	ДМСО	М/С	Полимиксин	Полимиксин + ДМСО	Полимиксин + М/С	М/С + ДМСО	Полимиксин + М/С + ДМСО
E. coli	11546	6,8×10 ⁶ *	2,2×10 ⁶	3,8×10 ⁴	6,10×10 ²	2,8×10 ²	2,0×10 ²	8,3×10 ³	0
	15636	2,0×10 ⁵	6,8×10 ⁵	5,6×10 ³	3,1×10 ⁴	8,9×10 ³	4,6×10 ²	6,2×10 ²	0
	10488	4,6×10 ⁶	4,2×10 ⁶	7,3×10 ⁴	2,8×10 ²	0	1,5×10 ²	5,6×10 ³	0
	11546	8,2×10 ⁵	1,0×10 ⁶	8,1×10 ³	3,4×10 ³	3,3×10 ³	8,0×10 ¹	0	0
	15911	8,0×10 ⁵	3,3×10 ⁵	2,0×10 ³	7,6×10 ³	5,2×10 ²	6,2×10 ²	8,9×10 ²	0
M**		2,64×10 ⁶	1,68×10 ⁶	2,39×10 ⁴	8,58×10 ³	2,60×10 ³	3,02×10 ²	3,08×10 ³	0
σ***		2,91×10 ⁶	1,79×10 ⁶	3,15×10 ⁴	1,28×10 ⁴	4,08×10 ³	2,29×10 ²	3,67×10 ³	0
C****		110	107	132	149	157	76	119	0
Kl	10694	4,2×10 ⁶	3,0×10 ⁶	9,1×10 ³	4,6×10 ³	6,4×10 ²	2,1×10 ²	5,2×10 ³	0
	15901	5,6×10 ⁶	6,1×10 ⁶	7,6×10 ³	3,8×10 ⁴	9,1×10 ³	6,4×10 ³	5,8×10 ²	2,5×10 ²
	14316	8,4×10 ⁶	4,2×10 ⁵	3,3×10 ³	8,0×10 ³	4,6×10 ³	8,2×10 ¹	2,2×10 ³	0
	15890	2,2×10 ⁶	1,2×10 ⁶	7,2×10 ⁴	2,5×10 ⁴	1,4000	1,6×10 ³	1,9×10 ³	3,1×10 ²
	15002	9,0×10 ⁵	2,8×10 ⁶	6,7×10 ²	7,4×10 ³	7,1×10 ³	1,0×10 ²	2,1×10 ²	0
M		4,26×10 ⁶	2,70×10 ⁶	1,85×10 ⁴	1,66×10 ⁴	7,09×10 ³	1,68×10 ³	2,02×10 ³	1,12×10 ²
σ		2,94×10 ⁶	2,19×10 ⁶	3,01×10 ⁴	1,44×10 ⁴	4,99×10 ³	2,72×10 ³	1,97×10 ³	1,55×10 ²
C		69	81	163	87	70	162	98	138
Ps	10	2,2×10 ⁶	9,1×10 ⁵	3,8×10 ⁴	5,2×10 ⁴	2,3×10 ³	8,8×10 ³	4,4×10 ³	1,3×10 ²
	24	5,6×10 ⁶	5,2×10 ⁶	2,1×10 ⁵	8,1×10 ³	3,7×10 ³	9,3×10 ²	5,3×10 ³	6,7×10 ¹
	26	3,8×10 ⁶	2,8×10 ⁶	5,2×10 ⁴	3,1×10 ⁴	4,5×10 ³	2,1×10 ³	6,2×10 ³	3,2×10 ²
	29	8,1×10 ⁶	8,4×10 ⁶	5,6×10 ⁴	8,7×10 ⁴	7,8×10 ³	1,4×10 ³	2,8×10 ³	9,8×10 ¹
	30	5,2×10 ⁶	4,0×10 ⁶	8,1×10 ⁴	9,6×10 ³	2,1×10 ³	9,1×10 ²	1,1×10 ⁴	0
M		4,98×10 ⁶	4,26×10 ⁶	8,74×10 ⁴	3,75×10 ⁴	4,08×10 ³	2,83×10 ³	1,55×10 ⁴	1,23×10 ²
σ		2,20×10 ⁶	2,80×10 ⁶	7,03×10 ⁴	3,30×10 ⁴	2,31×10 ³	3,37×10 ³	2,12×10 ⁴	1,20×10 ²
C		44	66	80	88	57	119	137	98

- * – КОЕ/мл (число колониеобразующих единиц);
- ** – среднее значение;
- *** – среднее квадратичное отклонение;
- **** – коэффициент вариации.

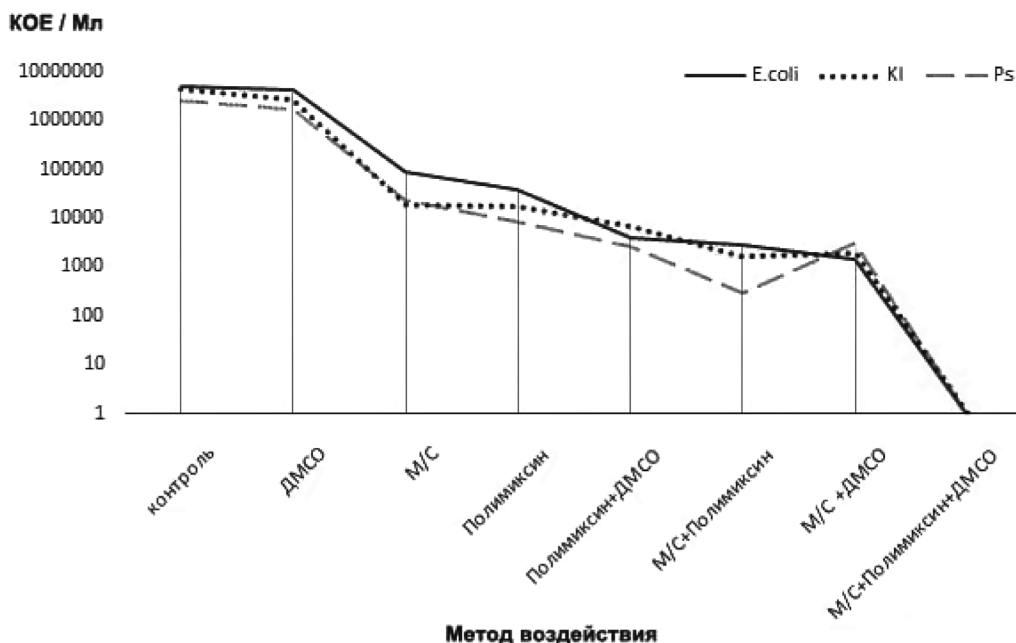


Рисунок 1. Результаты оценки эффективности комплексного антимикробного метода на основе фотодинамического воздействия в отношении грамотрицательных бактерий

зовалось их графическое представление. Графики строились в логарифмическом масштабе (рисунок 1).

Таким образом, изолированное фотодинамическое воздействие с использованием ФС метиленового синего проявляет недостаточно высокий антимикробный эффект в отношении грамотрицательных бактерий.

ДМСО в комбинации с фотодинамическим воздействием и полимиксином усиливает действие последних.

Совместное применение метиленового синего, ДМСО и полимиксина с последующим облучением в качестве АФДТ приводит к резкому снижению количества жизнеспособных грамотрицательных бактерий в эксперименте.

Литература

1. Карандашов, В. И., Петухов Е. Б., Зродников В. С. Фототерапия / под ред. академика Н. Р. Палеева. – М.: «МЕДИЦИНА», 2001. – С. 389.
2. Кирьянова, В. В. Антология света. Kosmetik International // Физиотерапевт. – 2005. – № 9.
3. Корабоев, У. М., Толстых М. П., Дуванский В. А., Усманов Д. Н. Изучение активности фотодинамической

Оригинальные научные публикации

терапии в эксперименте // Лазерная медицина. – 2001. – № 5(2). – С. 27–29.

4. Лапченко, А. А., Гуров А. В. Российская конференция оториноларингологии, 4-ая // Приложение // Вестник оториноларингологии. – 2005. – № 5. – С. 323–324.

5. Пальчун, В. Т., Лапченко А. С., Лапченко А. А., Гуров А. В., Кучеров А. Г. Современный взгляд на антимикробную фотодинамическую терапию // Вестник оториноларингологии. – 2007. – № 3. – С. 4–6.

6. Странадко, Е. Ф., Роль фотодинамической терапии в хирургии. Материалы научно-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 20-летию ФГУ «ГНЦ лазерная медицина Росздрава». – 2006 – С. 157–158.

7. Странадко, Е. Ф., Корабоев У. М., Толстых М. П. Хирургия. – 2000. – № 9. – С. 67–70.

8. Gales, A. C. и соавт.: Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. J Clin Microbiol 39 (2001). 183–190.

9. Hamblin, M. R., Demidova T. N. Photodynamic therapy targeted to pathogens. // Int. J. Immunopathol Pharmacol. – 2004. – № 17 (3). – С. 245–254.

10. Segalla, A., Borsarelli C. et al. Photobiol Sci. – 2002. – № 1. – С. 641–648.

Поступила 13.02.2015 г.