

МЕТОД ПОВЫШЕНИЯ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Т.А. Гречуха

Белорусский государственный медицинский университет

Введение. Фотодинамическая терапия (ФДТ) хорошо зарекомендовала себя в лечении патологически измененной ткани и злокачественных новообразований. Она селективна и позволяет избежать общего воздействия на организм. Онкологическая практика длительное время являлась основной областью применения ФДТ, и лишь сравнительно недавно появились данные о новых возможностях использования данного метода в других разделах медицины. В частности, это касается антимикробной фотодинамической терапии (АФДТ), характеризующейся широким спектром антимикробного действия, практически полным отсутствием побочных эффектов и неспособностью микроорганизмов формировать резистентность. Суть этого метода заключается в избирательной окислительной деструкции микроорганизмов при одновременном воздействии на них фотосенсибилизатора (ФС) и оптического излучения. Объектами АФДТ являются аэробные и анаэробные бактерии, вирусы, грибы и простейшие [4].

В последнее время ведется постоянный поиск новых способов повышения действия АФДТ при помощи ее комбинации с физическими факторами и некоторыми медикаментозными препаратами.

Цель исследования: оценка возможностей повышения антимикробной активности АФДТ с применением димексида. Димексид — синтетический препарат, действующим веществом которого является диметилсульфоксид (ДМСО). Он смешивается во всех соотношениях с водой и спиртом, обладает противовоспалительным с выраженным местнообезболивающим действием, усиливает

проницаемость наружной мембраны бактерий, что может повышать эффективность противомикробных средств.

Материалы и методы. Применяли светодиодное излучение красной области спектра с длиной волны 670 ± 2 нм, которая, по литературным данным, является наиболее эффективной в отношении штаммов бактерий – возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний за счёт проникновения в биологические ткани на глубину до 25 мм [2]. Для подбора времени светодиодного излучения использовали малогабаритный полупроводниковый лазерный терапевтический аппарат «Люзар-МП» производства Республики Беларусь. Мощность лазерного излучения на выходе излучателя составляла 15 мВт.

Тест-культурами являлись типовые штаммы грам+ и грам- бактерий (*Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, соответственно). В качестве фотосенсибилизатора применяли метиленовый синий (м/с), который считается наиболее чувствительным для данной спектральной области при его концентрации 10 мг/мл [3]. ДМСО, используемый в клинической практике при местном лечении, применяли в концентрации 30% [1]. С целью определения максимальной эффективности метиленового синего и ДМСО были исследованы различные варианты их применения: как последовательно (сначала метиленовый синий, затем ДМСО и наоборот – сначала ДМСО, затем метиленовый синий), так и в комбинации (навеску метиленового синего вносили непосредственно в раствор ДМСО). Для выбора оптимального времени экспозиции опытного раствора с тест-культурами бактерий использовали различные временные интервалы (5, 10 и 30 минут).

При проведении исследований тест-культуры бактерий в количестве 1,0 мл засеивали сплошным газонем на плотную питательную среду (мясопептонный агар) в чашках Петри, распределяли по ее поверхности с последующим удалением излишков стерильной пипеткой. Чашки помещали в термостат на 4 часа при 37°C , затем на поверхность среды наносили и распределяли 1,0 мл фотосенсибилизатора (м/с) или комбинированного раствора (метиленовый синий + ДМСО) и после определенной экспозиции облучали. Расстояние от светодиодной насадки до питательной среды составляло 2,0 см, что давало возможность распределить световой поток равномерно по всей поверхности посева. После фотообработки все чашки снова помещали в термостат. Антибактериальное действие ФДТ оценивали по количеству выживших колониеобразующих единиц (КОЕ) через 24 часа (рис. 1) [5].

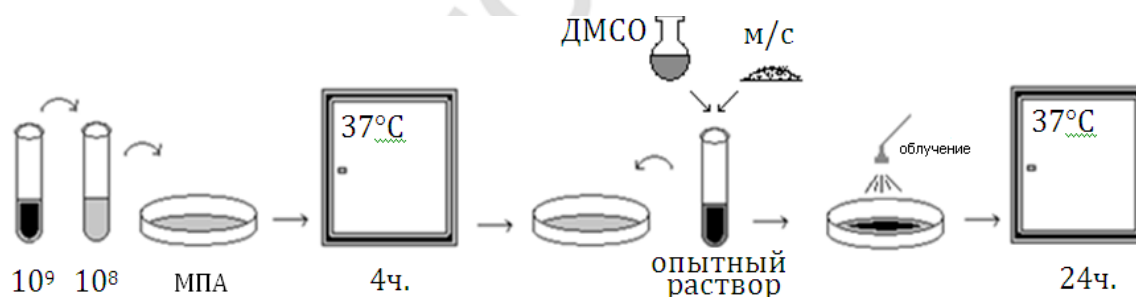


Рис. 1. Схема постановки опыта по оценке эффективности антимикробной фотодинамической терапии с применением ДМСО

В качестве контроля использовали интактную культуру (неподвергнутую вышеуказанному воздействию).

Результаты. При проведении исследований установлено, что эффективность АФДТ с дополнительным применением ДМСО возрастает при различных вариантах использования последнего. Однако, в большей степени это проявляется при его одновременном применении в комбинации с метиленовым синим (таблица 1).

Как видно из данной таблицы, коэффициент редукции (RF), отражающий различие в количестве КОЕ, для *S.aureus* составляет 5,6 с применением ДМСО, против 4,0 без него по сравнению с контролем (интактной культурой), а для *E.coli* — 5,7 против 4,2.

Таблица 1

Антибактериальная активность фотодинамического воздействия
при различных вариантах ее применения

Тест-культура	контроль (интактная культура)		варианты применения АФДТ											
			ФДТ (м/с)			ДМСО → м/с			м/с → ДМСО			м/с в растворе ДМСО		
	КОЕ	log	КОЕ	log	RF*	КОЕ	log	RF	КОЕ	log	RF	КОЕ	log	RF
<i>S. aureus</i>	2×10 ⁸ ±0,1	8,3	2×10 ⁴ ±0,1	4,3	4,0	1×10 ³ ±0,2	3,0	5,3	4×10 ³ ±0,2	3,6	4,7	6×10 ² ±0,1	2,7	5,6
<i>E. coli</i>	1×10 ⁸ ±0,3	8,0	6×10 ³ ±0,2	3,8	4,2	8×10 ² ±0,2	2,9	5,1	1×10 ³ ±0,1	3,0	5,0	2×10 ² ±0,1	2,3	5,7

Примечание. *Коэффициент редукции (RF) – разница логарифмов результатов в контроле и опыте.

При выборе экспозиции применения комбинированного раствора (метиленовый синий + ДМСО) показано (табл. 2), что оптимальным временем является 10 мин. Увеличение времени экспозиции до 30 мин. не приводит к возрастанию антибактериального эффекта ФДТ.

Таблица 2

Антибактериальная активность фотодинамического воздействия при различных экспозициях
комбинированного раствора

Время экспозиции	варианты АФДТ	<i>S. aureus</i>			<i>E. coli</i>		
		КОЕ	log	RF	КОЕ	log	RF
5 мин	Контроль культуры	2×10 ⁸ ±0,1	8,0		1×10 ⁸ ±0,3	8,3	
	ФДТ (м/с)	6×10 ⁴ ±0,3	4,8	3,2	8×10 ³ ±0,2	3,9	4,4
10 мин	ФДТ (м/с+ДМСО)	3×10 ³ ±0,2	3,5	4,5	1×10 ³ ±0,1	3,0	5,3
	ФДТ (м/с)	2×10 ⁴ ±0,1	4,3	4,0	6×10 ³ ±0,2	3,8	4,2
30 мин	ФДТ (м/с+ДМСО)	4×10 ² ±0,2	2,6	5,4	2×10 ² ±0,1	2,3	6,0
	ФДТ (м/с)	3×10 ⁴ ±0,1	4,5	3,5	6×10 ³ ±0,1	3,8	4,5
30 мин	ФДТ (м/с+ДМСО)	3×10 ² ±0,1	2,5	5,5	2×10 ² ±0,1	2,3	6,0

Подбор оптимального времени светодиодного облучения с применением комбинированного раствора показал (табл. 3), что таковым для обеих тест-культур является 5-минутная экспозиция.

Таблица 3

Антибактериальная активность фотодинамического воздействия с применением
комбинированного раствора при различном времени светодиодного облучения

Время облучения	Варианты АФДТ	<i>S. aureus</i>			<i>E. coli</i>		
		КОЕ	log	RF	КОЕ	log	RF
2,5 минуты	Контроль культуры	1×10 ⁸ ±0,2	8,0		1×10 ⁸ ±0,3	8,0	
	ФДТ (м/с)	8×10 ⁴ ±0,2	4,9	3,1	1×10 ⁴ ±0,1	4,0	4,0
	ФДТ (м/с+ДМСО)	5×10 ² ±0,3	2,7	5,3	1×10 ³ ±0,1	3,0	5,0
5 минут	ФДТ (м/с)	3×10 ⁴ ±0,1	4,5	3,5	6×10 ³ ±0,1	3,8	4,2
	ФДТ (м/с+ДМСО)	3×10 ² ±0,1	2,5	5,5	2×10 ² ±0,3	2,3	5,7
10 минут	ФДТ (м/с)	4×10 ⁴ ±0,2	4,6	3,4	5×10 ³ ±0,2	3,7	4,3
	ФДТ (м/с+ДМСО)	3×10 ² ±0,1	2,5	5,5	2×10 ² ±0,2	2,3	5,7

Выводы.

– *in vitro* на тест-культурах *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* установлено, что дополнительное применение ДМСО при проведении АФДТ с метиленовым синим значительно повышает ее эффект, который в большей мере проявляется при использовании комбинированного раствора данных препаратов;

– с целью достижения максимального антибактериального эффекта, на этих же тест-культурах отработаны оптимальное время экспозиции комбинированного раствора и продолжительность времени светодиодного облучения.

THE METHOD OF INCREASE OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF PHOTODYNAMIC THERAPY

T.A. Grechukha

In vitro on the base of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* substrates it was revealed, that the additional usage of DMSO increases the effectiveness of PDT therapy with methylene blue the marked effectiveness was reached by using the combined solution; for achieving the ultimate antibacterial effectiveness the optimal endurance of exposition of the combined solution and duration of the light-emitting diode radiation was evaluated on the same substrates.

Литература.

1. Абаев Ю.К. Лекарственные средства в лечении ран // Медицинские знания. – 2010. – № 6. – С.2-5.
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 терапии в эксперименте // Лазерная медицина. – 2001. №5(2). – С.27-29.
4. Лапченко А.С., Лапченко А.А. Некоторые аспекты антимикробной фотодинамической терапии // Пятая научно-практическая конференция «Фармакологические и физические методы лечения в оториноларингологии», 24-25 мая 2007 года, г. Москва. – М., 2007. – С 40-41.
5. Hamblin M.R., Demidova T.N. Photodynamic therapy targeted to pathogens. // Int J Immunopathol Pharmacol.– 2004. – №17(3). – С.245-254.