

УДК 615.28

## К ВОПРОСУ О ПОВЫШЕНИИ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИМИКРОБНОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Баженов Л.Г., Садыков Р.А., Косникова И.В., Садыков Р.Р., Касымова К.Р.

*Республиканский специализированный центр хирургии им. ак. В.Вахидова,  
Ташкентская медицинская академия, Ташкент, Республика Узбекистан*

## ON QUESTION OF THE INCREASE IN EFFECTIVENESS OF THE ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY

Bajenov L.G., Sadykov R.A., Kosnikova I.V., Sadykov R.R., Kasymova K.R.

*Republican Specialised Centre of Surgery named after Academician V. Vahidov,  
Tashkent Medical Academy, Tashkent, Republic of Uzbekistan*

### Аннотация

Целью работы явилось сравнительное изучение антимикробного действия применяемых в фотодинамической терапии (ФДТ) растворов метиленового синего (МС) в зависимости от их pH. Максимальный антибактериальный эффект ФДТ в отношении *Klebsiella pneumoniae* достигался при использовании 0,05% буферного раствора МС с pH 8,0 с тенденцией к его усилению при pH 9,0. Возрастание pH растворов МС наряду с усилением воздействия на мембрану грамотрицательных микроорганизмов приводило к сдвигу спектра поглощения излучения в длинноволновую сторону.

**Ключевые слова:** антимикробная фотодинамическая терапия, эффективность, фотосенсибилизаторы, метиленовый синий, pH-растворов

### Abstract

The aim of the work was the comparative study of antibacterial activity of methylene blue solutions, applied in photodynamic therapy (PDT) depending on their pH-level. The maximal PTD antibacterial activity was observed in relation to *Klebsiella pneumoniae* using 0,05% methylene blue buffer solution with pH 8,0; with tendency to its intensification with pH 9,0. The rise of pH-level of methylene blue solutions alongside with growing effect on membrane of gram negative microorganisms led to the shift of absorption spectrum of radiation to long-wavelength part.

**Keywords:** antimicrobial photodynamic therapy, effectiveness, photosensitizers, methylene blue, pH-level of solutions.

Антибактериальная фотодинамическая терапия (ФДТ) является альтернативой антибиотикотерапии и заключается в избирательной окислительной деструкции патогенных микроорганизмов при комбинированном воздействии фотосенсибилизатора (ФС) и светового излучения с определенными параметрами [5].

Метиленовый синий (МС) из группы фенотиазинов известен как ФС, применяемый для антимикробной ФДТ, не обладающий токсичностью и относительно инертный к живым организмам [5,7]. МС - окислительно-восстановительный индикатор, восстановленная форма его бесцветна, окис-

ленная – синего цвета, окислительно-восстановительный потенциал при pH 7+0,011 В, при pH 0 +0,53 В. Хорошо известно его антисептическое действие, в некоторых клинических случаях она вводится внутривенно, в частности при лечении токсической метгемоглобинемии. МС для инъекционных 1% растворов должен иметь pH не ниже 3,9. Применение его в качестве антидота при отравлениях основано на роли акцептора и донатора ионов водорода в организме [2].

Механизмы антимикробного эффекта сенсibilизированной МС фототерапии находятся в стадии исследования. Некоторые авторы связывают их с тем, что внутриклеточное воздействие света реализуется

через химические (фотоокисление, фотовосстановление, фотодиссоциация и др.) и физические процессы превращения энергии [3]. Одним из механизмов может быть прямой фотохимический процесс, связанный с активным поглощением света молекулярным кислородом на длинах волн 638 и 762 нм [2] и усилением свободнорадикальных процессов [1].

**Целью работы** явилось сравнительное изучение антимикробной активности применяемых в ФДТ растворов МС в зависимости от уровня их рН.

#### **Материалы и методы**

В работе использовали полирезистентный госпитальный штамм *Klebsiella pneumoniae* 360. Его суточную культуру высевали газоном на чашки Петри с агаром Мюллера-Хинтона. Затем на чашку пастеровской пипеткой наносили 2 капли раствора МС и после 10 минутной экспозиции проводили световое воздействие аппаратом ФДУ-1 с длиной волны 630 нм на расстоянии 2 см от чашки в течение 1, 5 и 10 минут. Суммарная мощность лазерного излучения не превышала 5 Вт, применяли непрерывный режим излучения с плотностью мощности в фокусе до 200 мВт/см<sup>2</sup>. Результаты регистрировали через 24 часа. В работе использовали 0,01% и 0,05% растворы МС, приготовленные на дистиллированной воде и на 0,06 М фосфатном буфере с различным рН. Спектры поглощения МС исследовали на спектрофотометре Acta-C-III фирмы «Beckman» (США).

#### **Результаты и обсуждение**

Для выбора оптимальной концентрации МС предварительно исследовали 0,01%, 0,05%, 0,1% и 0,5% водные растворы МС. Было установлено, что рН водных растворов МС находится в обратно пропорциональной зависимости от их концентрации: более концентрированные растворы имеют более низкий уровень рН. Отмечалось, что рН водных растворов МС нестабилен, при их хранении наблюдается тенденция к его сдвигу в щелочную сторону, более концентрированные растворы, имеющие более низкое значение рН, менее стабильны. рН водных растворов возрастает с повышением их температуры, в более концентрированных растворах эта зависимость сильнее. Также изучали изменения рН водных растворов после лазерного облучения. В фотосенсибилизированных водных растворах МС отмечена тенденция к сдвигу рН в щелочную сторону, при более высокой концентрации она менее выражена. В то же время растворы красителя, приготовленные на фосфатном буфере, оказались более стабильными, их рН после фотосенсибилизации лазерным излучением не изменялся. Выбранные, как наиболее оптимальные, 0,01% и 0,05% растворы МС, приготовленные на фосфатном буфере, были использованы для работы с культурой микроорганизмов.

Бактерицидное действие водного 0,01% раствора МС отмечалось только после 10 минутного облучения. При использовании буферного раствора с рН 7,0 и 8,0 оно проявлялось уже через 5 минут облучения с увеличением эффекта при возрастании рН и продолжительности облучения.

Значительно большей эффективностью обладали 0,05% растворы МС. Установлено, что при облучении лазером в течение 1 и 5 минут эффективнее были буферные 0,05% растворы с более высоким рН, чем водные. Чем выше был рН раствора, тем наблюдался менее интенсивный рост. При использовании растворов с рН 8,0 и 9,0 зоны отсутствия микробного роста, возрастая после первых минут облучения, после 10-минутного облучения оставались такими же, как и после 5-минутного облучения.

Отдельно взятые в качестве контроля буферные растворы, как с низким, так и высоким рН не проявляли бактерицидных свойств.

Известно, что эффективность ФДТ зависит от совпадения пика поглощения ФС с пиком излучения светового потока. Разработанная нами установка ФДУ-1 имеет пик излучения в спектре 630±10 нм, а пик поглощения МС соответствует 620 нм. Нашими исследованиями установлено, что изменение рН МС в щелочную сторону приводит к возрастанию пика поглощения излучения до 630 нм. Тем самым происходит практически полное соответствие оптических параметров ФС и светоизлучающей установки.

Клебсиеллы — грамотрицательные эллипсоидные бактерии, хорошо растущие на простых питательных средах, факультативные анаэробы, хемоорганотрофы. Оптимальная температура их роста 35-37°C, рН 7,2—7,4. Существует значительное различие в чувствительности к фотосенсибилизации между грамположительными и грамотрицательными бактериями, что связано с различиями в их трехмерном строении.

Клебсиеллы — грамотрицательные эллипсоидные бактерии, хорошо растущие на простых питательных средах, факультативные анаэробы, хемоорганотрофы. Оптимальная температура их роста 35-37°C, рН 7,2—7,4. Существует значительное различие в чувствительности к фотосенсибилизации между грамположительными и грамотрицательными бактериями, что связано с различиями в их трехмерном строении.

Внешняя мембрана грамотрицательных бактерий образует физический и функциональный барьер для взаимодействия с окружающей средой [7].

Возрастание бактерицидной активности с увеличением pH раствора МС может быть связано с повышением проницаемости мембраны для фотосенсибилизатора за счет снижения поверхностного натяжения. Эффект ФДТ усиливается также вероятно и вследствие соответствия оптических параметров ФС и установки ФДУ-1. В то же время наблюдаемая нами относительно низкая бактерицидная активность фотосенсибилизированных растворов МС при низком pH, может быть связана со свойством *K. pneumoniae* приобретать толерантность к повышенной кислотности [4].

#### Выводы

1. Максимальной антибактериальной активностью в отношении *K. pneumoniae* обладает ФДТ при 10 минутном воздействии с применением в качестве ФС 0,05% буферного раствора метиленового синего с pH 8,0 и ФДТ в течение 5 минут при использовании буферного раствора метиленового синего с pH 9,0.

2. Увеличение pH растворов МС наряду с усилением воздействия на мембрану грамотрицательных микроорганизмов приводит к сдвигу спектра поглощения излучения в длинноволновую сторону.

#### Список литературы

1. Журавлева Л.А. Светотерапия при тонзиллитах/ Л.А. Журавлева, И.И. Чанков, Т.В. Коннова// Сборник научно-практических материалов первого межрегионального совещания: 15-16 января 2004, Томск. – 2004. – С. 29-32.
2. Захаров С.Д., Иванов А.В.// Квант.электроника, 1999. - Т. 29 - С. 192– 214.
3. Чанков И. И., Хлусов И. А. Способ лечения хронического тонзиллита. Патент РФ №2235568. Приоритет от 20.01.2003. Оpubл. 24.03.2004, Б.И. №30.
4. Aghi P., Chhibber S. Adaptive acid tolerance in *Klebsiella pneumoniae* // Indian Journal of Medical Microbiology. - 1999. - V.17, Issue 2. - P.81-84.
5. De Paula L., Santos R., Menezes H. et al. A comparative study of irradiation systems for photoinactivation of microorganisms // J. Braz. Soc. - 2009. - V. 1 - P.1-7.
6. Luksiene Z., Zukauskas A. Prospects of photosensitization in control of pathogenic and harmful microorganisms// J. of Applied Microbiology, 2009. - March. – P.11-32.
7. Tarvido J., Giglio A., De Olivera C. et al. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. - 2005. - V.2, Issue 3, September.- P.175-191..

Поступила в редакцию 21.02.2017

#### Сведения об авторах:

Баженов Леонид Григорьевич – Республиканский специализированный центр хирургии им. ак. В.Вахидова, докт.мед.наук, профессор, e-mail: leobaj@tps.uz