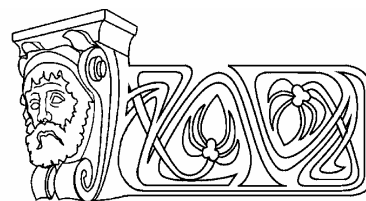




УДК 535+57 (023)

ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ КРАСНОГО (625 нм) И ИНФРАКРАСНОГО (805 нм) ИЗЛУЧЕНИЯ НА БАКТЕРИИ *P. ACNES*, ОБРАБОТАННЫЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРАМИ



Е.С. Тучина, В.В. Тучин, Г.Б. Альтшулер*, И.В. Ярославский*

Саратовский государственный университет,
кафедра

* Паломар Медикал Технолоджис, Бурлингтон, США

E-mail: firstflower@yandex.ru

Исследованы закономерности индуцированного красным и инфракрасным излучением подавления колониеобразующей способности бактерий *Propionibacterium acnes* в присутствии таких фотосенсибилизаторов, как метиленовый синий и индоцианин зеленый. Установлен дозозависимый эффект действия красного и инфракрасного излучения. Полученные результаты рассматриваются с точки зрения оценки эффективности действия излучения в сочетании с фотосенсибилизаторами при фотодинамической терапии кожных гнойно-воспалительных заболеваний.

Photodynamic Influence of Red (625 nm) and Infra-Red (805 nm) Radiation on Bacteria *P. Acnes* Processed by Photosensitizers

E.S. Tuchina, V.V. Tuchin, G.B. Altshuler, I.V. Yaroslavsky

It was shown, that *Propionibacterium acnes* was rather subjected to action of red and infrared radiation. The effect of the given radiation amplified at this bacteria by various solutions of photosensitizers. The received results are considered from the point of view of an estimation of light action efficiency in a combination to photosensitizers at photodynamic therapy skin suppurative inflammation diseases.

Введение

В последние десятилетия лазерная и световая терапия активно развивается и находит широкое применение при лечении кожных заболеваний [1–3].

Acne vulgaris является хроническим заболеванием сальных желез и встречается достаточно часто. Наибольший интерес в данном случае представляют бактерии *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*). Микроорганизмы этого вида входят в состав нормальной микрофлоры кожи человека и заселяют сальные железы. Это грамположительные анаэробные или микроаэрофильные палочки неправильной формы. Особенностью физиологии *P. acnes* является синтез и накопление значительного количества порфирина [4–6].

Как правило при лечении угревой сыпи назначают антибактериальные препараты, а также ретиноиды. Подобная терапия имеет

недостатки, связанные с индивидуальными особенностями пациентов, длительностью и способом применения антибиотиков [7].

Фототерапия может стать удачной альтернативой при лечении угревой сыпи. Применение подобных методов стало возможным в результате исследований по взаимодействию света и биотканей, а также благодаря развитию лазерной и светодиодной техники [8, 9].

В настоящей работе мы исследовали в условиях *in vitro* чувствительность микроорганизмов *P. acnes* к действию красного (625 нм) и инфракрасного (805 нм) излучения в сочетании с применением фотосенсибилизаторов – метиленового синего и индоцианина зеленого.

1. Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовали штамм *Propionibacterium acnes* Ac-1450 (коллекция ИБФМ РАН). Микроорганизмы выращивали при температуре 37°C на агаризованной тиогликолевой среде с добавлением 5%-ной гемолизированной кроличьей крови или 0.02% БСА. Посевы инкубировали в анаэробном состоянии в бескислородной среде (газовая смесь N₂:CO₂ = 9:1).

Источником красного излучения служил мощный светодиод с максимумом спектра испускания на длине волны 625 нм и плотностью мощности 31 мВт/см². В ходе экспериментов в качестве источника лазерного излучения использовали лазер (OPC-BO15-MMM-FCTS, Opto Power Corp., Tucson, Arizona) с максимумом спектра испускания на длине волны 805 нм, световодным выходом и плотностью мощности 50 мВт/см² на поверхности среды. Время облучения варьировали от 5 до



30 мин, тем самым набирали дозу облучения, необходимую для подавления образования колоний бактериями.

Для проведения экспериментов использовали 8- или 96-луночную полистирольную планшету с круглодонными ячейками. Содержимое одной ячейки соответствовало одной экспериментальной точке. При проведении опытов по воздействию света источник излучения располагали точно над соответствующей ячейкой. Для достижения необходимой плотности мощности излучения выбирали расстояние от центра ячейки до источника света: 1,5 см – для красного (625 нм) светодиода; 50 см – для инфракрасного (805 нм) лазера. После проведения эксперимента содержимое каждой ячейки переносили с помощью микропипетки на поверхность плотной питательной среды и равномерно распределяли стерильным шпателем.

В качестве фотосенсибилизаторов использовали индоцианин зеленый (ИЗ) и метиленовый синий (МС). Индоцианин зеленый готовили в концентрации 0.1% на основе дистиллированной воды и смеси глицерина, этанола и воды в соотношении 25:45:30. Метиленовый синий готовили в концентрации 0.025% на основе дистиллированной воды и смеси глицерина, этанола и воды в соотношении 25:25:50.

Способность бактерий к образованию колоний оценивали по числу выросших колоний после посева на агаризованную среду анализируемых образцов соответствующих разведений и их выращивания в анаэробных условиях при 37 °С в течение 5 суток.

В работе использовали реактивы фирм «Sigma» (Сент-Луис, США) и индоцианин зеленый производства Aldrich Chemical Co., USA.

Для проведения экспериментов использовали трехсуточную культуру исследуемого штамма *P. acnes*. Методом последовательных разведений достигали концентрации бактериальной взвеси 1000 микробных клеток на миллилитр (мк/мл). Из разведения микроорганизмов 10000 мк/мл 1 мл взвеси вносили в 9 мл растворов фотосенсибилизаторов (ФС), инкубировали в течение 10 мин без доступа света. Из конечного разведения, а также из растворов ФС, взвесью объемом 0.2 мл вносили в ячейки экспериментальной планше-

ты. После воздействия светом в течение 5, 10, 15 и 30 мин культуру переносили на чашки Петри с плотной питательной средой и равномерно распределяли по поверхности агара стерильным шпателем. Учет результатов проводили путем подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ) через 5 дней после инкубации при 37 °С. Принято считать, что одна колония на плотной питательной среде является потомством одной микробной клетки. Таким образом, при количественном учете оказываемого воздействия правомерно подсчитывать КОЕ – данный показатель отражает количество выживших под действием неблагоприятного фактора бактериальных клеток. Контролем служили данные колониеобразующей способности бактерий: 1) не обработанных фотосенсибилизаторами и 2) не подвергнутых облучению. Каждая экспериментальная точка является усреднением 10 проведенных опытов.

2. Результаты

Для определения возможной токсичности красителей определяли колониеобразующую способность (КОС) бактерий после их инкубации с фотосенсибилизаторами без облучения. Из рис. 1, а следует, что метиленовый синий не воздействует на КОС микроорганизмов только в концентрации меньше 0.025%. Концентрация индоцианина зеленого < 0.1% не оказывает токсического действия на микроорганизмы (рис. 1, б).

Из литературных данных известно, что длительность обработки клеток микроорганизмов фотосенсибилизаторами может привести к бактериостатическому или бактерицидному эффекту или, напротив, быть недостаточной для достижения фотоинактивации [7]. Представляло интерес изучить закономерности подавления размножения бактерий фотосенсибилизаторами. Для этого клетки преинкубировали с красителями различное время и учитывали число КОЕ. На рис. 2 представлены данные по изменению показателя КОЕ в зависимости от времени преинкубации бактериальных клеток в растворе красителя. Как оказалось, 10–15 мин преинкубации с фотосенсибилизатором достаточно для достижения при последующем облучении значительного снижения КОЕ *P. acnes*.

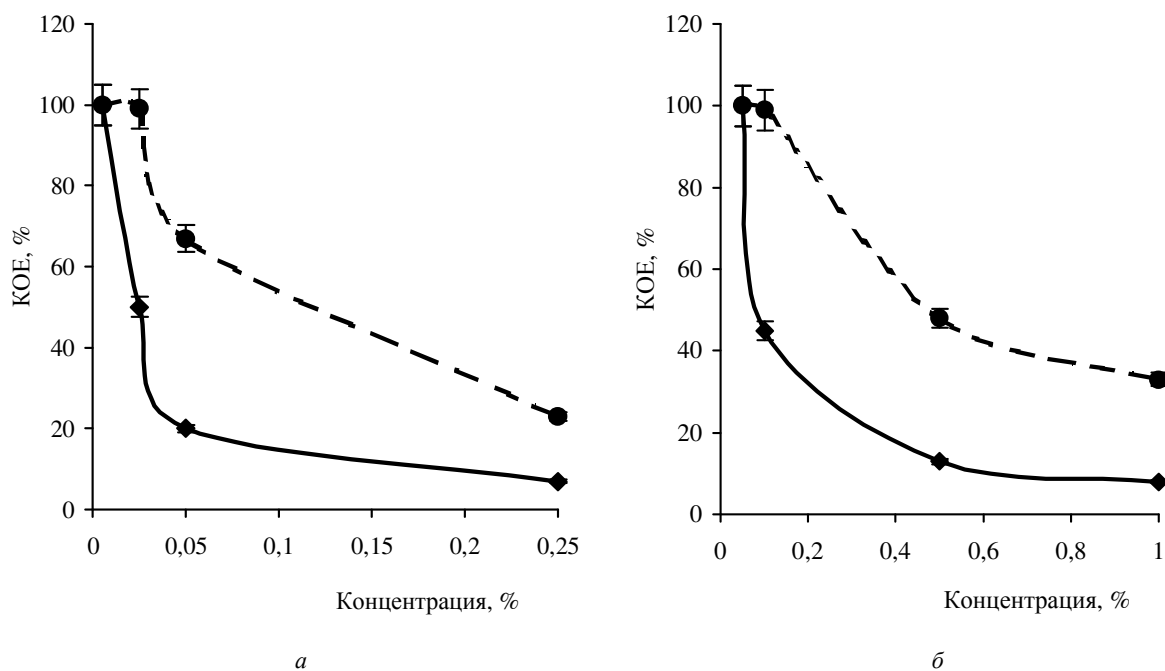


Рис. 1. Влияние различных концентраций красителей в темноте (●) и при облучении (◆) на колониеобразующую способность *P. acnes*: а – обработка метиленовым синим; б – обработка индоцианином зеленым. Воздействовали красным 625 нм и инфракрасным 805 нм излучением в течение 5 мин

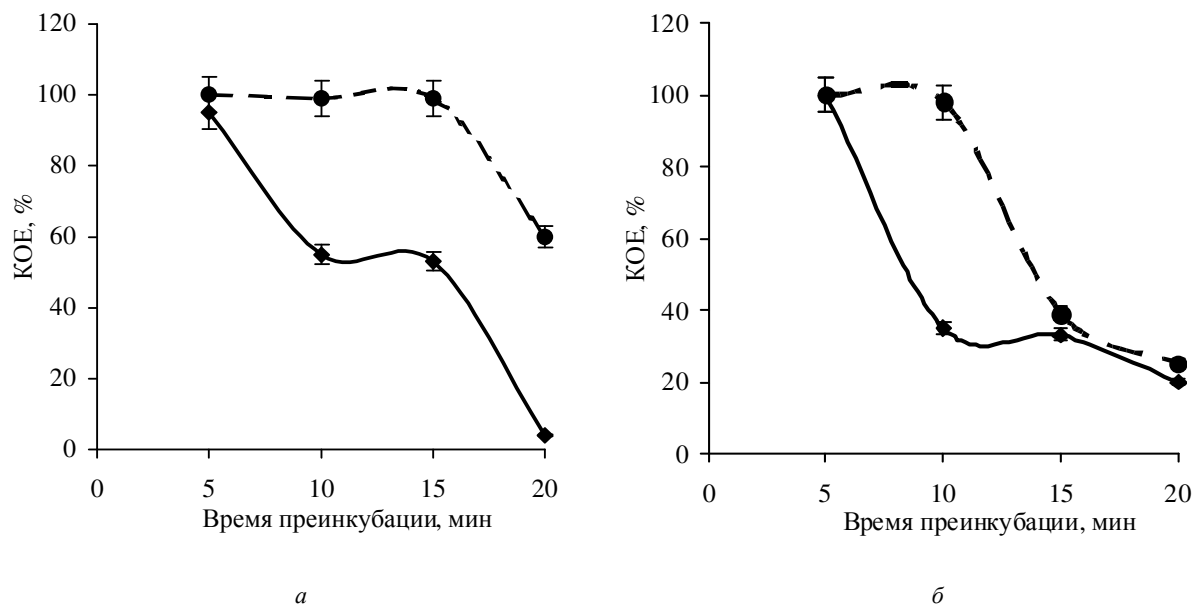


Рис. 2. Зависимость выживаемости бактерий *P. acnes* от длительности преинкубации с красителями в темноте (●) и при облучении (◆): а – с 0.025% метиленовым синим; б – с 0.1% индоцианином зеленым. Воздействовали красным 625 нм и инфракрасным 805 нм излучением в течение 5 мин



Использование красного излучения (625 нм) при фотовоздействии на *P. acnes* было достаточно эффективным. Снижение числа КОЕ происходило после 5 мин облучения на 33%, после 10 мин – на 20%, после 15 мин – на 34%, после 30 мин – на 51%. Применение водного раствора МС в качестве фотосенсибилизатора обуславливало снижение числа КОЕ под воздействием красного излучения в течение 5 мин на 50%, в течение 10 мин – на 40%, в течение 15 мин – на 42%, в течение 30 мин – на 100%. Обработка бактериальных клеток МС в лосьоне на основе глицерина и спирта с последующим действием красного излучения приводило к уменьшению показателя КОЕ на 60% после 5 мин облучения, на 58% – после 10 мин, на 95% – после 15 мин, на 100% – после 30 мин (рис.3).

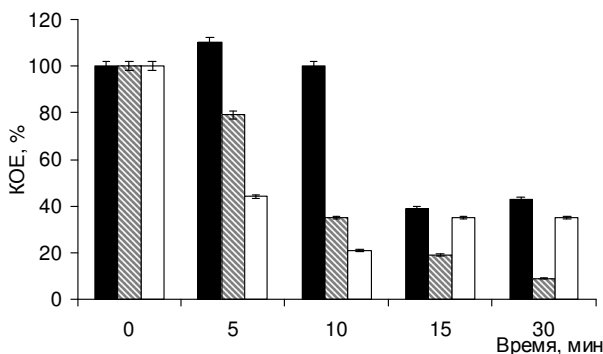


Рис. 3. Действие красного излучение (625 нм) на выживаемость *P. acnes*: ■ – красное излучение, ▨ – излучение и водный раствор красителя, □ – излучение и раствор красителя в лосьоне

Воздействие лазерным излучением с длиной волны 805 нм на *P. acnes* в течение 5 мин стимулировало размножение клеток данного микроорганизма, увеличение числа КОЕ относительно контроля составило 10%. Значение КОЕ не отличалось от контрольного после 10 мин воздействия инфракрасного излучения. Сокращение числа КОЕ под действием облучения происходило после 15 мин – на 60%, после 30 мин – на 53%. Применение водного раствора ИЗ в качестве фотосенсибилизатора обуславливало снижение числа КОЕ под воздействием инфракрасного излучения в течение 5 мин на 24%, в течение 10 мин – на 62%, в течение 15 мин – на 80%, в течение 30 мин – на 90%. Обработка бактериальных

клеток ИЗ в лосьоне на основе глицерина и спирта с последующим действием красного излучения приводила к уменьшению показателя КОЕ на 58% после 5 мин облучения, на 79% – после 10 мин, на 63% – после 15 мин, на 64% – после 30 мин (рис. 4).

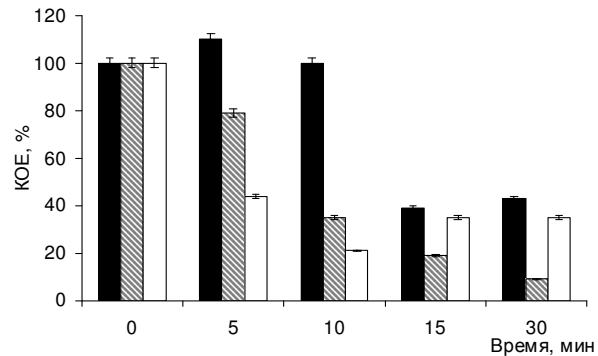


Рис. 4. Действие инфракрасного излучения (805 нм) на выживаемость *P. acnes*: ■ – инфракрасное излучение, ▨ – излучение и водный раствор красителя, □ – излучение и раствор красителя в лосьоне

3. Обсуждение

Патогенез угревой сыпи пока недостаточно изучен. По всей видимости, этот процесс обусловлен множеством факторов, в том числе уровнем выделения кожного сала и частотой образования микрокамедонов. *P. acnes* превращает триглицериды сала, изначально обладающие противомикробными свойствами, в безвредные для микроорганизмов жирные кислоты, что приводит к активному развитию транзиторных микроорганизмов. Бактериальные метаболиты служат хемоаттрактантами для лейкоцитов макроорганизма. Известно, что данные клетки играют большую роль в формировании очага воспаления и иммунном ответе, в результате их деятельности и происходит образование камедонов [10].

Использование красного излучения для фотодинамической терапии угревой сыпи является весьма эффективным. Рядом авторов показано, что применение красного светодиода (660 нм) и лазерного излучения (805 нм) в сочетании с соответствующими фотосенсибилизаторами или синим (415 нм) излучением сокращает количество воспаленных угрей на коже пациента, приводит к ускоренному их заживлению [3, 8, 9], в процес-



се светолечения происходит повышение секреции цитокинов фагоцитами, что стимулирует пролиферацию фибробластов кожи, влечет за собой снижение продукции кожного сала и способствует более быстрому обновлению эпидермиса [10].

Лазерная и световая терапия с длинами волн 400–700 нм находит терапевтическое обоснование ввиду фотохимических особенностей молекул порфиринов – эндогенных красителей в клетках *P. acnes*. Наиболее эффективно порфирины поглощают свет с длинами волн 400–420 нм, что соответствует так называемой полосе Core. Но существуют и Q-полосы менее эффективно поглощающие излучение с длинами волн 500–700 нм. Подобное воздействие приводит к образованию порфиринами активных радикалов, которые незамедлительно вызывают разрушение бактериальной клетки [11]. При недостаточном содержании эндогенных порфиринов роль сенсibilизаторов успешно выполняют соответствующие экзогенные красители [8, 9].

Полученные данные об эффективном подавлении размножения бактерий *P. acnes*, обработанных фотосенсibilизаторами, под действием красного (625 нм) и инфракрасного (805 нм) излучения, скорее всего, связаны с многофакторным воздействием в условиях эксперимента, которые в значительной степени соответствуют условиям световой терапии угревой сыпи. А именно в технологии лечения предварительно производится косметическая чистка кожи, что влечет за собой более эффективное снабжение тканей сальной железы, где развиваются бактерии, кислородом воздуха.

Наши эксперименты в той части, где идет облучение светом, проводились на открытом воздухе, поэтому кислородный фактор в некотором подавлении микробной флоры должен быть учтен при интерпретации результатов. С одной стороны, из наших экспериментов следует, что при используемых длительностях облучения на воздухе (5–30 мин) кислородный фактор не является определяющим, тем не менее он может несколько модифицировать отклик бактерий. Интересно в этом смысле проследить за поведением бактерий при воздействии красного

излучения на несенсibilизированные бактерии (см. рис. 3). Хорошо видно, что увеличение времени облучения от 5 до 30 мин приводит сначала к некоторому снижению КОЕ, затем к его повышению и опять к некоторому снижению. Явно видно, что происходит конкуренция нескольких разнонаправленных процессов. Это, во-первых, подавляющее действие кислорода и возбужденных порфиринов, а во-вторых, процесс биостимуляции (более эффективного размножения бактерий) под действием света, который хорошо известен [12]. Важно, что даже действие разведенного в воде фотосенсibilизатора МС, который менее эффективен, чем он же при разведении в глицерино-спиртовом лосьоне, с действием кислорода не могут противостоять биостимуляции. И только к 30-й мин наблюдается резкое уменьшение КОЕ.

Мы также впервые в этой работе обнаружили биостимулирующее действие ИК излучения (805 нм) на бактерии (см. рис. 4), которое компенсируется действием кислорода только к 10-й мин облучения. При этом к 10-й мине мы имеем довольно сильное снижение числа КОЕ для обоих растворов фотосенсibilизатора при разведении ИЗ в воде и глицерино-спиртовом лосьоне. При этом лосьон оказывается более эффективным растворителем.

Как было показано ранее [8, 9, 13], глицерино-спиртовой раствор способствует более эффективному прокрашиванию биотканей за счет увеличения проницаемости мембран клеток, а также способствует более стабильному и сильному поглощению света молекулами фотосенсibilизатора, что в целом соответствует результатам настоящей работы, но уже при исследованиях на микроорганизмах.

Некоторая противоречивость результатов для ИК излучения при времени облучения более 15 мин, когда более эффективным оказывается водный раствор, а в глицерино-спиртовом растворе начинается даже относительный рост числа КОЕ, требует дальнейшего исследования. Возможно, что при сравнительно длительном действии света происходит модификация самих растворов, которая изменяет условия подавления роста бак-



терий. Тем не менее по результатам наших исследований для ИК излучения можно сделать важный практический вывод: время облучения при выбранной плотности мощности 50 мВт/см² не должно превышать 10 мин при использовании глицерино-спиртового растворителя.

Авторы выражают признательность Л.Е. Долотову за разработку светодиодного облучателя и помощь при проведении экспериментов.

Представленные результаты получены в ходе работ по гранту CRDF RUB1-570-SA-04 при финансовой поддержке Palomar Medical Technologies, Burlington, USA.

Библиографический список

1. Ross E.V. Acne, Lasers and Light // *Advances in Dermatology*. 2005. Vol.21. P.1–32.
2. Nitzan Y., Dror R., Ladan H., Malik Z., Kimel S., Gottfried V. Structure-activity relationship of porphyrines for photoinactivation of bacteria // *Photochem. Photobiol.* 1995. Vol.62. P.342–347.
3. Papageorgiou P., Katsambas A., Chu A.. Phototherapy with blue (415 nm) and red (660 nm) light in the treatment of *acne vulgaris* // *British. J. Dermatol.* 2000. №142. P.973–978.
4. Kjeldstad B., Johnsson A. An action spectrum for blue and near ultraviolet inactivation of *Propionibacterium acnes*: with emphasis on a possible porphyrin photosensitization // *Photochem. Photobiol.* 1986. Vol.43. P.67–70.
5. Simpson N. Antibiotics in acne: time for a rethink // *British. J. Dermatol.* 2001. №144. P.225–227.
6. Kawada A., Aragane Y., Sangen Y., Tezuka T. Acne phototherapy with a high-intensity, enhanced, narrow-band, blue light source: an open study and *in vitro* investigation // *J. Dermatol. Sci.* 2002. Vol.30. P.129–135.
7. Hongcharu W., Taylor C.R., Chang Y. D. Topical ALA-photodynamic therapy for the treatment of *acne vulgaris* // *J. Invest Dermatol.* 2000. Vol.115. P.183–192.
8. Tuchin V.V., Genina E.A., Bashkatov A.N., Simonenko G.V., Odoevskaya O.D., Altshuler G.B. A pilot study of ICG laser therapy of *acne vulgaris*: Photodynamic and photothermolysis treatment // *J. Lasers in Surg. and Med.* 2003. Vol.33, №5. P.296–310.
9. Genina E.A., Bashkatov A.N., Simonenko G.V., Odoevskaya O.D., Tuchin V.V., Altshuler G.B. Low-Intensity ICG-Laser Phototherapy of *Acne Vulgaris*: A Pilot Study // *J. Biomed. Opt.* 2004. Vol.9, №4. P.828–834.
10. Анфимова Н.А., Потеев Н.Н., Ткаченко С.Б., Шугнина Е.А. Фотодинамическая терапия: патогенетическое обоснование эффективности при вульгарных угрях // *Эксперим. и клин. дерматокосметология*. 2005. №5. С.125–130.
11. Mariwalla K., Rohrer T. Use of lasers and light-based therapies for treatment of *acne vulgaris* // *J. Lasers in Surg. and Med.* 2005. Vol.37. P.333–342.
12. Ovchinnikov I.S., Shoub G.M., Tuchin V.V. Photodynamic effect of laser radiation and methylene blue on some opportunistic pathogenic microorganisms of oral cavity // *Proc. SPIE*. 2000. Vol.4001. P.390–392.
13. Genina E.A., Bashkatov A.N., Sinichkin Yu.P., Kochubey V.I., Lakodina N.A., Altshuler G.B., Tuchin V.V. *In vitro* and *in vivo* study of dye diffusion into the human skin and hair follicles // *J. Biomed. Opt.* 2002. Vol.7. P.471–477.