

УДК 579.831.86:615.849.19

Бондаренко В.М., Коновалова Г.Н., Николаева Е.В., Кузиков А.Н., Лихачева Е.В.

Эффект фотодинамического воздействия металлокомплексов производных хлорина Е6 на условно-патогенные бактерии с использованием сверхъярких светодиодов «холодного» белого света

Bondarenko V.M., Konovalova G.N., Nikolajeva E.V., Kuzikov A.N., Likhacheva E.V.

Effects of photodynamic impact of metal-complexes of chlorine E6 derivatives at conditionally pathogenic bacteria using super bright light-emitting diodes of «cold» white light

ГУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи», РАМН;
ФГУ «ГНЦ лазерной медицины Росздрава»

Цель. Исследование влияния облучения сверхъяркими светодиодами «холодного» белого света на условно-патогенные бактерии, sensibilizированные раствором металлокомплексов производных хлорина Е6. **Материалы и методы.** Были проведены исследования по сорбции бактериями различных таксономических групп раствора фотосенсибилизатора металлокомплексов производных хлорина Е6. Для выявления фотодинамического эффекта был применен излучатель, выполненный на светодиодах, являющихся источником видимого света в диапазоне 430–680 нм. В работе использовали культуры *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Propionibacterium acnes* и *Candida albicans*. **Результаты.** Окрашивание клеток фотосенсибилизатором, содержащим металлокомплексы производных хлорина Е6, указывает на сорбцию фотосенсибилизатора клеточной поверхностью микроорганизмов в течение 5–10 мин. На примере *S. aureus* выявлен факт гибели микробных клеток с использованием фотосенсибилизатора, содержащего металлокомплексы производных хлорина Е6, и прибора, выполненного на сверхъярких диодах, и определены пороговые значения плотности энергетической световой дозы, необходимой для полной гибели бактерий в растворе. **Ключевые слова:** фотодинамическая терапия, металлокомплексы производных хлорина Е6, плотность энергетической световой дозы, сверхъяркие светодиоды.

Purpose. To study effects of irradiation of conditionally pathogenic bacteria sensibilised with the solution of metal complexes of chlorine E6 derivatives with super bright light-emitting diodes of «cold» white light. **Materials and methods.** To find out photodynamic effects an emitter with light diodes has been used generating in the visible range at 430–680 nm. In this work the following cultures has been used. **Results.** Staining of cells with photosensitizers including metal complexes indicates that the absorption of photosensitizers with cellular surface of the microorganisms takes place during 5–10 min. Having *S. aureus* as an example the authors have seen microbial cells' death after they were treated with photosensitizer and irradiated with light from the diodes; they also have determined threshold limits for the density of energetic dose necessary for the complete death of bacteria in the solution. **Key words:** photodynamic therapy, metal complexes of chlorine E6 derivatives, density of energetic light dose, super bright light-emitting diodes.

Введение

Чаще всего возбудителями воспалительных процессов кожи лица человека являются различные виды патогенных и условно-патогенных грампозитивных и грамотрицательных бактерий, в том числе *Staphylococcus aureus* [8], *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Propionibacterium acnes* и *Candida albicans*. Наиболее часто при фурункулах лицевой области обнаруживают *Staphylococcus aureus*, в то время как при акне – *Propionibacterium acnes*. Поэтому возможно подавление нежелательной флоры методом фотодинамической терапии (ФДТ).

В отличие от фотодинамической терапии, используемой для разрушения поверхностных опухолей, где основой является цитотоксическое воздействие на ткань опухоли [4], в данной работе для избирательного воздействия на стафилококки было применено облучение «холодным» видимым светом в диапазоне 430–680 нм нетепловой интенсивности [1]. Большинство фотосенсибилизаторов, применяемых в ФДТ, обладают способностью поглощать свет в красной области спектра, имеющего способность глубокого проникновения в ткани [5]. Учитывая способность ряда бактерий к повышенной сорбции неко-

торых фотосенсибилизаторов [6], ФДТ с применением фотосенсибилизаторов в спектре их поглощения может оказаться перспективным методом лечения ряда пиодермий, *Acne vulgaris* и других инфекционных заболеваний кожи и слизистых [7].

Материалы и методы исследования

1. Сорбционные свойства раствора металлокомплексов производных хлорина Е6

В первой серии опытов были проведены исследования по окраске бактерий различных таксономических групп раствором металлокомплексов производных хлорина Е6, входящих в состав геля «Морион» [2] (сертификат соответствия РОС RU.ПР 73.В 23589).

Окраску микробных клеток проводили двумя способами:

1. Путем добавления 0,2 мл 0,075% раствора металлокомплексов производных хлорина Е6 к 0,2 мл взвеси живых бактерий (*S. aureus*, *S. pyogenes*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. acnes* и *C. albicans*) в физиологическом растворе хлористого натрия (соотношении 1:1) с последующей экспозицией в течение 5, 10 и 15 минут, затем каплю окрашиваемых бактерий

наносили на предметное стекло, распределяя суспензию по поверхности стекла, мазок высушивали и микроскопировали.

2. Путем приготовления мазка, для чего каплю бульонной культуры бактерий (*S. aureus*, *S. pyogenes*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. acnes* и *C. albicans*) распределяли по поверхности предметного стекла, мазок фиксировали над пламенем горелки, наносили каплю 0,05% раствора мориона и экспонировали с целью окрашивания микробных клеток в течение 5, 10 и 15 минут. Мазки ополаскивали физиологическим раствором хлористого натрия и после высушивания микроскопировали ($\times 900$).

Результаты данных опытов показали, что в приготовленных мазках микробные клетки прокрашиваются раствором металлокомплексов производных хлорина Е6 в светло-желтый цвет, начиная с 5 мин, далее происходит нарастание интенсивности окрашивания до темно-коричневого цвета в течение последующих 10 минут. Сорбция происходит по законам термической диффузии из исходного раствора при комнатной температуре. При этом среднее время броуновского перемещения молекул красителя при среднем расстоянии между клетками порядка 100 мкм составляет несколько десятков секунд. Окрашивание клеток раствором металлокомплексов производных хлорина Е6 указывает на сорбцию фотосенсибилизатора клеточной поверхностью микроорганизмов, что определяет возможность проведения ФДТ. Фиксацию металлокомплексов производных хлорина Е6 на поверхности микробных клеток наблюдали как для грампозитивных бактерий (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* группы А, *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes*), так и для грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) и грибов *C. albicans*.

2. Облучение светодиодом клеток *Staphylococcus aureus*, обработанных гелем металлокомплекса производных хлорина Е6

2.1. Подготовка биомассы штамма *S. aureus* 209 для исследования

В соответствии с методикой культивирования факультативных анаэробов бактерии эталонного штамма выращивали на кровяном агаре (5 мл дефибринированной крови на 100 мл 2% питательного бульона, рН 7,4–7,6) при 37 °С в течение 3–4 часов. Для приготовления суспензии использовали 3–4-часовую агаровую культуру *S. aureus*. Выращенную биомассу *S. aureus* смывали стерильным физиологическим раствором (0,9% раствор хлорида натрия, забуференный фосфатами до нейтрального рН), перемешивая суспензию для получения равномерной взвеси, суспензию доводили до стандарта мутности 0,6 ФЭК (конечная концентрация $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл) и разводили еще в 100 раз физиологическим раствором до конечной концентрации $1,5\text{--}2,0 \times 10^6$ КОЕ/мл.

Для культивирования облигатных анаэробов *P. acnes* 101 использовали среду фирмы HiMedia (Индия). Чашки со средой, засеянной *P. acnes*, помещали в устройство GENbox фирмы bioMerieux (Франция) емкостью 2,5 литра, анаэробные условия в котором создавали с помощью газового генератора внутреннего действия GENbox Anaerob. Чашки с засеянными бактериями помещали в GENbox, который устанавливали в термостат при температуре 37 °С и инкубировали в течение 48 часов.

Для приготовления суспензии использовали 3–4-часовую агаровую культуру *S. aureus* и 48-часовую агаровую культуру *P. acnes*. Выращенную биомассу *P. acnes* смывали стерильным 0,9% физиологическим раствором, перемешивая суспензию для получения равномерной взвеси. Суспензию доводили до мутности стандарта 0,6 ФЭК (конечная концентрация $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл) и разводили еще в 100 раз физиологическим раствором до конечной концентрации $1,5\text{--}2,0 \times 10^6$ КОЕ/мл. Приготовленную описанным выше способом суспензию бактериальных клеток в объеме 0,5–1,0 мл помещали в стерильную одноразовую пластиковую чашку диаметром 35 мм и подвергали обработке в соответствии с алгоритмом. Для определения колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл использовали метод серийных разведений. Для этого 0,1 мл разведения контрольных и опытных образцов вносили в чашку с соответствующим питательным агаром и инкубировали при 37 °С в течение 1–2 суток для стафилококков. Полученные данные использовали для пересчета количества бактерий в исследуемом образце и контроле. Из каждой серии производили высев параллельно на 3 чашки с агаром. Определив число бактерий, выросших на каждой из трех чашек, вычисляли среднее число КОЕ/мл. Для каждой серии производили контрольный посев микроорганизмов, не подвергшихся обработке.

2.2. Облучение микробной суспензии и учет результатов

Фототоксический эффект металлокомплекса производных хлорина Е6 исследовали на клетках *S. aureus*. С этой целью суспензию стафилококков разводили физиологическим раствором хлористого натрия до конечной концентрации $(6,6\text{--}7,0) \times 10^5$ КОЕ/мл. Приготовленную описанным выше способом суспензию бактериальных клеток в объеме 1,0 мл помещали в стерильную одноразовую пластиковую чашку диаметром 35 мм и подвергали обработке в соответствии с алгоритмом, при этом высота слоя суспензии составляла 0,2 см. Для определения колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл использовали метод серийных разведений. Для этого 0,1 мл разведения контрольных (не подвергшихся обработке) и опытных образцов вносили в чашку с соответствующим питательным агаром и инкубировали при 37 °С в течение 1–2 суток для стафилококков и 2–3 суток для *P. acnes*, после чего подсчитывали количество

выросших колоний. Из каждой серии производили высеив параллельно на 3 чашки с агаром. Определив число бактерий, выросших на каждой из трех чашек, вычисляли среднее число КОЕ/мл. Для каждой серии опытов производили контрольный посев микроорганизмов, не подвергавшихся воздействию облучения.

2.3. Характеристика металлокомплексов производных хлорина Е6

Исследование фототоксического эффекта выполняли с металлокомплексами производных хлорина Е6, имеющими характерные полосы повышенного оптического поглощения 370–430 (405), 480–515 (505), 640–680 (660) нм (в скобках указано положение максимумов). Данный продукт представляет собой водный раствор темно-зеленого цвета с концентрацией металлокомплексов производных хлорина Е6 0,05%. Оптическая плотность слоя суспензии с 0,025% концентрацией фотосенсибилизатора (концентрация $3 \times 10^{17} \text{ см}^{-3}$) не превышала $2,9 \text{ см}^{-1}$.

2.4. Характеристика облучателя и параметры облучения

Использовали как единичный излучатель (плотность мощности $5\text{--}10 \text{ мВт/см}^2$), так и излучатель, состоящий из нескольких светодиодов, – прибор «Мориофор» (плотность мощности 16 мВт/см^2). Прибор «Мориофор» (сертификат соответствия № РОСС RU. ME67.В 042203) выполнен на светодиодах типа GNL R20-3000HP, которые являются источниками «холодного» видимого света в диапазоне 430–680 нм (по уровню 10%). Существенно, что доля энергии в синей области составляет около 35% (410–470 нм). Световой поток 30 лм, оптическая мощность 48 мВт, световая эффективность 40 лм/Вт. Следует отметить, что спектр излучения прибора достаточно хорошо совпадает со спектром поглощения геля, в состав которого входят металлокомплексы производных хлорина Е6 [1].

Как показали измерения, при прохождении облучения через смесь металлокомплексов производных хлорина Е6 и суспензию микроорганизмов в слое толщиной 0,2 см поглощалось около 45% падающей энергии. Суспензии культур облучали с расстояния 100 мм в пластиковых чашках диаметром 35 мм, при этом световое пятно было близким к диаметру чашки площадью порядка 10 см^2 .

2.5. Опыты по фотодинамическому воздействию на клетки *S. aureus*, обработанные гелем с содержанием металлокомплексов производных хлорина Е6

Опыты с облучением бактерий *S. aureus* 209P были проведены в три этапа.

1-й этап. Контрольный. Изучение антимикробного действия различных концентраций геля в условиях фонового освещения.

Для этого суспензию бактериальных клеток объемом 1 мл смешивали с равным объемом геля и

помещали в чашку Петри диаметром 35 мм, искусственное освещение (в пределах 100 лк) производили в затемненном помещении. В процессе опыта микробные клетки находились в стационарной фазе с возможным замедлением метаболической активности.

Через 5, 10, 15, 20, 30 и 80 мин забирали по 0,1 мл смеси, делали серийные десятикратные разведения с последующим высеиванием на чашки с МПА. Учет результатов проводили после термостатирования посевов в течение суток.

2-й этап. Обработка излучением единичного излучателя.

3-й этап. Обработка излучением излучателя, выполненного на нескольких светодиодах типа GNL R20-3000HP.

Результаты

1. Результаты 1-го этапа приведены в графах «Контроль» табл. 1 и 2.

Таблица 1
Эффект гибели клеток *S. aureus* при единичном источнике излучения (плотность облучения $4,5 \text{ Дж/см}^2$)

Экспозиция облучения	Плотность дозы облучения, падающая/поглощенная (Дж/см^2)	Исходная концентрация бактерий без облучения (КОЕ в 1 мл) (1 см^2)	Концентрация после облучения (КОЕ в 1 мл)	Процент гибели клеток
15 мин	4,5/2,0	$(6,9\text{--}7,0) \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	66
80 мин	24/11	$(6,9\text{--}7,0) \times 10^5$	Ед. клетки	99
Контроль	4,5/0 24/0	$(6,9\text{--}7,0) \times 10^5$	$6,8 \times 10^5$	В пределах нормы

Таблица 2
Эффект гибели клеток *S. aureus* 209P при групповом источнике излучения (плотность облучения $9,6 \text{ Дж/см}^2$)

Экспозиция облучения	Плотность дозы облучения, падающая/поглощенная (Дж/см^2)	Исходная концентрация бактерий без облучения (КОЕ в 1 мл, 1 см^2)	Концентрация после облучения (КОЕ в 1 мл)	Процент гибели клеток (%)
10 мин	9,6/4,2	$6,6 \times 10^5$	$0,6 \times 10^2$	99
20 мин	9,6/4,2	$6,6 \times 10^5$	0 (нет роста)	100
30 мин	9,6/4,2	$6,6 \times 10^5$	0 (нет роста)	100
40 мин	9,6/4,2	$6,6 \times 10^5$	0 (нет роста)	
Контроль Освещение 100 лк				
10 мин		$6,6 \times 10^5$	$6,6 \times 10^5$	В пределах ошибки роста
20 мин		$6,6 \times 10^5$	$6,6 \times 10^5$	
30 мин		$6,6 \times 10^5$	$6,6 \times 10^5$	
40 мин		$6,6 \times 10^5$	$6,6 \times 10^5$	

Фоновое облучение фактически не вызывает гибели клеток и, следовательно, не имеет ФДТ-активности.

2. Исследование фотодинамического воздействия излучения единичного излучателя (5 мВт/см^2) на бактериальные клетки *S. aureus* в присутствии металлокомплексов производных хлорина Е6 концентрацией 0,025% отражено в табл. 1. Следует отметить, что энергия полного цитотоксического эффекта, отнесенная к одной клетке, составила порядка $3\text{--}4 \times 10^{-5}$ Дж/клетку или $1\text{--}1,3 \times 10^{13}$ квант/клетку.

3. Результаты второй серии опытов, проведенных с клетками *S. aureus* при использовании излучателя, состоящего из 6 светодиодов (16 мВт/см^2), приведены в табл. 2.

Как видно из данных табл. 2, уже 10 мин облучения в этих условиях обуславливало гибель почти 100% микробных *S. aureus*: выживали 60 клеток из 660 000.

Обсуждение

В последние годы интенсифицированы исследования в области разработки и внедрения новых медицинских технологий, включая фотодинамическую терапию, в клиническую практику при различных заболеваниях [3].

Основной задачей данной работы было определение фототоксичности изучаемого фотосенсибилизатора с содержанием металлокомплексов производных хлорина Е6 и характеристик оптического излучения видимого диапазона (410–680 нм) при использовании высокопатогенного штамма *S. aureus* 209Р. Предварительно были проведены опыты по сорбции фотосенсибилизатора (геля, содержащего металлокомплексы производных хлоринов Е6) микробными клетками пропионобактерий, стафилококков, стрептококков, клебсиелл и грибов рода *Candida*, вегетирующих на коже лица в составе неслучайных микробиоценозов, нередко являющихся этиологическими факторами развития гнойно-воспалительных поражений кожи и сальных желез.

Опыты по сорбции были успешными со всеми видами микробов различных таксономических групп, включая *P. acnes*.

Опыты на свету при обработке бактерий металлокомплексами производных хлорина Е6 снижения количества жизнеспособных клеток не обуславливали. Данные по сорбции его на поверхности клеток *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. acnes*, *E. coli*, *K. pneumoniae* и грибов рода *Candida* позволяют прогнозировать возможность их гибели в режиме использования оптического излучения видимого диапазона (430–680 нм) с повышенным энергосодержанием в синей части 430–465 нм.

Таким образом, с определенной долей уверенности можно считать, что если в патогенезе гнойно-воспалительных процессов кожи лица играют роль указанные нами выше микроорганизмы, включая *P. acnes*, применение ФДТ с использованием фотосенсибилизатора, содержащего металлокомплексы производных хлорина Е6 в сочетании с оп-

тической активацией прибором, выполненным на светодиодах типа GNL R20-3000HP, может явиться новым и эффективным методом лечения. Можно прогнозировать возможность эффективного лечения и *acne vulgaris*. Сочетанные методы могут позволить добиться хороших клинических результатов в краткие сроки лечения заболевания, что обеспечит ряд преимуществ перед применяемыми до сих пор методиками.

В настоящей работе на культуре *S. aureus* определены пороговые значения плотности энергетической световой дозы для полной гибели бактерий в растворе металлокомплексов производных хлорина Е6 и установлена определенная зависимость эффекта гибели от падающей плотности излучения.

Выводы

1. Показана возможность эффективной сорбции на поверхности микробных клеток *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. acnes*, *E. coli*, *K. pneumoniae* и грибов *C. albicans* фотосенсибилизатора (геля, содержащего металлокомплексы производных хлорина Е6) из раствора концентрацией 0,025%, при этом насыщение сорбции происходит в течение 5–10 минут.

2. На культуре *S. aureus* выявлен факт гибели микробных клеток с использованием фотосенсибилизатора, содержащего металлокомплексы производных хлорина Е6, и прибора, выполненного на светодиодах типа GNL R20-3000HP.

3. Определены пороговые значения плотности энергетической световой дозы для полной гибели бактерий в растворе металлокомплексов производных хлорина Е6 концентрацией 0,025%.

4. Таким образом, гель «Морион» является перспективным средством для лечения ряда кожных заболеваний при отсутствии возможных противопоказаний для его применения (заболевания, сопровождающиеся повышенной фоточувствительностью).

Литература

1. Армицев А.В., Алексеев Ю.В. Новый прибор для фотодинамического воздействия на кожу на базе сверхярких светодиодов «холодного» белого света // Материалы научно-практической конференции «Современные достижения лазерной медицины и их применение в практическом здравоохранении». М., 2006. С. 195.
2. Алексеев Ю.В., Миславский О.В., Николаева Е.В., Решетников А.В., Армицев А.В. Изучение проницаемости кожи для различных производных хлорина Е6 на экспериментальных животных // Материалы научно-практической конференции «Современные достижения лазерной медицины и их применение в практическом здравоохранении». М., 2006. С. 136.
3. Гейниц А.В., Цыганова Г.И. Аналитический обзор научно-исследовательских работ, выполненных в 2006 году в учреждениях здравоохранения Российской Федерации по проблемам лазерной медицины // Лазерная медицина. 2007. 11 (4). С. 35.
4. Страчадо Е.Ф. Механизмы действия фотодинамической терапии // Российский онкологический журнал. 2000. № 4. С. 52–56.

5. Странадко Е.Ф. Исторический очерк развития фотодинамической терапии // Лазерная медицина. 2002. Т. 6. № 1. С. 4–8.
6. Странадко Е.Ф., Рябов М.В., Терехов С.М., Макаренков А.С., Смирнова Т.Д., Яшуевский Д.В., Нифонтьев Н.Э. Методические особенности проведения экспериментальных исследований фотосенсибилизаторов в культуре клеток // Лазерная медицина. 2002. Т. 6. № 1. С. 38–43.
7. Дуванский В.А. Фотодинамическая терапия в комплексном лечении больных с острыми гнойными заболеваниями мягких тканей // Лазерная медицина. 2003. Т. 7. № 3–4. С. 41–45.
8. Noble W. Skin bacteriology and the role of *Staphylococcus aureus* in infection // Br. J. Dermatol. 1998. 53. P. 9–12.

Поступила в редакцию 18.03.08