

поглощения фотосенса на 1 нм в диапазоне рН от 7,4 до 5,5 может оказывать причиной недостаточно эффективной ФДТ при узком пике излучения лазера. Однако ФДТ применяется в средах с широким диапазоном рН (мочевой пузырь, плевральная полость и т. д.). Продолжение исследований в этом направлении, безусловно, позволит выявить новые закономерности влияния рН внутриорганной среды на фотофизические свойства различных фотосенсибилизаторов.

Заключение

Степень acidификации бронхоальвеолярного секрета находится в прямой связи с эндобронхиальными воспалительными изменениями.

Фотосенсибилизатор Фотосенс в 0,2% концентрации изменяет свои фотофизические свойства в зависимости от рН среды, смещая пик длины волны поглощения до 5 нм при изменении рН от 1,5 до 9,0. Измерение рН внутриорганной среды с использованием простых доступных устройств позволяет получать важную дополнительную информацию для проведения ФДТ и сделать заключение о выраженности патологического процесса, особенно при эндобронхиальных процессах. Для успешного проведения эндобронхиальной ФДТ с препаратом Фотосенс необходимо корректировать длину волны излучения в соответствии с рН бронхоальвеолярного секрета.

Литература

1. Васильев Н.Е. // Лазерная медицина. – 1999. – № 3 (3–4). – С. 16.
2. Васильев Н.Е., Денисов А.Н. // Лазерная медицина. – 2000. – № 4 (1). – С. 39–40.
3. Васильев Н.Е., Денисов А.Н., Соколова М.Л. // Лазерная медицина. – 1999. – № 3 (3–4). – С. 21.
4. Кузнецова Н.А., Каляя О.Л. // Российский химический журнал. – 1998. – № 5. – С. 36–49.
5. Лукьянец Е.А. // Российский химический журнал. – 1998. – № 5. – С. 12.
6. Музыченко А.В., Култанов А.Г. // Лазерная медицина. – 1999. – № 3 (3–4). – С. 24.
7. Нормы в медицинской практике. – М.: Мед. Пресс, 1999. – С. 18.
8. Огиренко А.П., Кобцев С.М., Денисов А.Н. // Лазерная медицина. – 1999. – № 3 (3–4). – С. 82–84.
9. Brasseur L et al. // Photochem. Photobiol. – 1998. – 47 (5). – P. 705–711.
10. Hunt J.F., Fang K., Malik R. et al. // Am. er. J. Respir. Crit. Care Med., – 2000. – Vol. 161, № 3. – P. 694–699.
11. Ostler R.B., Scully A.D., Taylor A.G., Gould I.R. et al. // Photochemistry and Photobiology. – 2000. – 71 (4). – P. 397–404.
12. Tanielian Ch., Mechin R., Seghrouchni R., Schweitzer C. // Photochemistry and Photobiology. – 2000. – Vol. 71 (1). – P. 12–19.

The pH of intraorgans fluids as one from initial parameters for photodynamic therapy

N. Vassiliev, V. Romanov

Is shown, that the inflammation of bronchus changes pH of a secret from 7,4 till 5,6,3.

The modification pH of a medium within the limits of 7,4–1,5 changes of a wavelength of absorption of PHOTOSENS with 675 up to 680 nm.

These modifications are necessary for taking into account for realizations of photodynamic therapy.

УДК 616-022.7-085.849.19:578.76

Н.Е. Васильев, А.П. Огиренко

Антимикробная фотодинамическая терапия

Сибирский центр лазерной медицины, г. Новосибирск

Ключевые слова: антимикробная ФДТ, неонкологическая ФДТ, фотосенсибилизаторы, устойчивость бактерий, чувствительность бактерий

В последние годы заметны достижения в области антибактериальной терапии, однако проблема инфекционных заболеваний остается одной из главных во многих областях медицины.

Сегодня наиболее агрессивными и устойчивыми к антибактериальным препаратам являются такие широко распространенные патогены, как *E. coli*, *S. aureus*, стрептококки [10, 35]. При тяжелой форме инфекции – сепсисе – наиболее часто встречающимися патогенными микроорганизмами являются стафилококки, грибы, энтерококки [4, 9]. Устойчивость возбудителей к антибиотикам и необходимость проведения системного лечения создают множество вторичных проблем (проблема нефро- и гепатотоксичности, нейротоксичности, невозможность достижения высокой концентрации антибиотика в оча-

ге поражения). Одна из таких проблем – проблема системной токсичности антибактериальных препаратов. Она может быть рассмотрена с точки зрения «волшебной пули» [44], гипотетически представляющей антимикробное средство, целевым образом доставляемое в очаг поражения и взаимодействующее только с возбудителем инфекционного заболевания, но не с тканями и клетками организма-хозяина. В данном контексте таким средством представляется фотодинамическая терапия (ФДТ), т. е. селективное накопление фотосенсибилизатора (ФС) и локальное энергетическое воздействие.

Первым опубликованным сообщением о возможности фотоинактивации микроорганизмов было сообщение о влиянии солнечного света на микроорганизмы (простейших) с использовани-

ем в качестве ФС акридинового красителя. При воздействии солнечного света культура *Paramecium*, предварительно инкубированная с акридиновым оранжевым, была успешно инактивирована, о чем сообщил О. Raab в 1900 г. [31].

В начале XX в. идею «волшебной пули» высказал Пауль Эрлих, предположив, что инкубация бактерий с красителем метиленовым голубым должна вызывать их гибель при световом воздействии.

В настоящее время антимикробная фотодинамическая терапия (АФДТ) [44, 49] использует опыт, накопленный при ФДТ опухолей. Локальное распределение ФС, локальное световое воздействие, применение светолоконой оптики и эндоскопической техники позволяют в некоторых случаях получать хороший клинический эффект.

До сих пор наиболее активно исследуемой областью АФДТ являются исследования *in vitro* межклеточного взаимодействия активированного ФС и возбудителя инфекционного заболевания. Исследованы практически все ФС и красители, все источники света и большинство возбудителей инфекционных заболеваний.

Так, Z. Malik с соавторами [24] в ставшем классическим обзоре сообщили о бактерицидном действии ФДТ на *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium perfringens*, *E. coli*, *Mycoplasma hominis*, грамотрицательные микроорганизмы и дрожжевые грибки [24].

А. Minnock с соавт. [27] показал, что большинство грамотрицательных и грампозитивных бактерий может быть успешно фотоинaktivировано с применением водорастворимых фталоцианинов [28]. В настоящее время установлена возможность фотоинaktivации безоболочечных вирусов, включая ВИЧ [29, 11], с применением такого простого ФС, как метиленовый синий. Достаточно эффективно подвергаются фотодинамической инaktivации грибы, в том числе в форме спор [22]. Для фотоинaktivации используется как лазерное излучение различной длины волны в общей световой дозе от 1,5 до 100 Дж/см² [44], так и нелазерные источники света: например при фотоинaktivации вирусов в эритромазе длительного хранения с применением ФС диметилметилена голубого и широкополосного белого света [42]. М. Griffiths [21] показал, что культура метициллинуостойчивого стафилококка в виде взвеси может быть успешно инактивирована с применением дисульфированного фталоцианина алюминия в концентрации 6,25 мг/л и излучения диодного лазера с длиной волны 673 нм и общей световой дозой 41,7 Дж/см². Подтверждена возможность фотодинамической инaktivации микробных ассоциаций в областях, легкодоступных для светового воздействия, например в полости рта [33, 41].

В 1990 г. появилось сообщение о том, что выделенные из мертвой ткани *Helicobacter pylori* после инкубации с сульфированным алюминия фталоцианином были успешно убиты излучением лазера длиной волны 675 нм в дозе 1,5 Дж/см². Отмечено, что повреждающего действия на слизистую оболочку такая доза не оказала [12]. Вопросы фотодинамической инaktivации *H. pylori* и ее эффективность по сравнению с классической эрадикационной терапией рассмотрены в 1992 г. на 57-м конгрессе Американской школы гастроэнтерологии, причем, несмотря на отсутствие широкомасштабного клинического эксперимента, предпочтение явно отдано фотодинамической инaktivации [48]. В этом же году было сообщено, что производные гематопопорфина инaktivируют *H. pylori* в культуре при воздействии лазерного излучения в дозе 50 Дж/см² [47]. Европейская лазерная ассоциация в 1997 г. опубликовала работу С.Е. Milson с соавт. [26], в которой сообщалось, что *H. pylori* после инкубации с метиленовым синим, толуидиновым голубым и производными гематопопорфина была успешно инактивирована при дозах 50 и 200 Дж/см². Наилучший эффект фотоинaktivации наблюдался при дозе 50 Дж/см² с метиленовым синим. В работе отмечено, что доза 50 Дж/см² находится далеко за пределами повреждающего воздействия лазерного излучения на слизистую оболочку желудка [26]. Кроме того, С.Е. Milson (1998) опубликовал подробную статью о проведении доклинических испытаний фотоинaktivации *H. pylori in vitro* на животных. Работа была проведена с использованием красителей толуидинового голубого, метилтениония хлорида, производных гематопопорфина, алюминия фталоцианина, аминоклевулиновой кислоты и с применением различных лазеров (гелий-неоновый с длиной волны 632,8 нм и на арсениде галлия, причем обе лазерные установки используются в стоматологии). Без лазерного воздействия гематопопорфин и фталоцианин проявляли умеренное бактерицидное действие.

Действие прочих фотосенсибилизаторов было выражено в той или иной степени, но максимальный эффект при минимальной дозе лазерного излучения достигнут при использовании метилтениония хлорида (метиленовый синий) и цинка фталоцианина [25]. Показана эффективность АФДТ и ФДТ вирусов *in vitro* с такими ФС, как аминоклевулиновая кислота [40], псорален (с активацией УФ-излучением) [19], мероцианин 540 [38], аминокридин (профлавин, акридиновый оранжевый) [43]. Среди перспективных методов деконтаминации тромбоцитной массы для переливания рассматривается ФДТ с псораленом [45].

Исходя из общих принципов ФДТ опухолевых заболеваний, ведется поиск путей повыше-

ния селективности накопления ФС возбудителями инфекционных заболеваний. Комбинированное воздействие ФДТ с метиленовым синим и слабого электрического тока (1 мА) на кишечную палочку *in vitro* с целью усиления эффекта ФДТ повышает эффективность ФДТ [16]. Интересен эффект предварительного лазерного облучения бактерий перед инкубацией с ФС. В случаях, когда АФДТ применялась к таким высокоустойчивым бактериям, как микробактерия туберкулеза, предварительное лазерное облучение нарушало структуру клеточной оболочки *in vitro* и делало бактерию более восприимчивой к АФДТ [3].

ФС, конъюгированные с антителами к бактериям, способны повысить эффективность АФДТ [13]. Так, показана высокая эффективность *in vitro* конъюгатов хлорина Е6 с поли-Л-лизинном для АФДТ патогенной микрофлоры полости рта. Применение конъюгата позволило снизить световую дозу до 15 Дж/см² и повысить эффективность ФДТ [39]. S. Devanathan с соавт. [17] показал, что конъюгаты флюоресцентных красителей изотиоцианатов с антителами к бактериям, ранее используемые для флюоресцентной диагностики, успешно фотоинактивируют кишечную палочку и сальмонеллу при воздействии нелазерным излучением УФ-диапазона (450–600 нм).

Ведется поиск повышения эффективности антибактериальной терапии с использованием стандартных коммерческих антибактериальных препаратов и лекарственных средств путем изменения их фотохимических свойств воздействием когерентного и некогерентного излучения различного диапазона. Так, P. Bilski с соавт. [14] показал, что эндогенный витамин В₆ (пиридоксин) в сочетании с нелазерным излучением УФ-диапазона (400–550 нм) оказывает выраженный токсический эффект на грибы семейства *Cercospora in vitro*. Антибактериальные препараты группы флуорхинолонов (офлоксацин, ломефлоксацин), разрешенные к клиническому применению во многих странах, способны при УФ-облучении генерировать активные формы кислорода как по I, так и по II механизму, чем и объясняется их кожная фототоксичность при воздействии солнца [20]. Использование флуорхинолонов как ФС для проведения АФДТ активно рассматривается [34]. Способность блокатора циклооксигеназы кетопрофена при УФ-облучении (10–100 нм) генерировать перекисные радикалы также позволяет рассматривать его как перспективный ФС для проведения АФДТ [32].

Бактерицидное и бактериостатическое воздействие АФДТ на возбудителей инфекционных заболеваний осуществляется посредством генерации синглетного кислорода и перекисных радикалов фотосенсибилизаторами, находящими

ся вне- и внутриклеточно, с последующим развитием каскада фототоксических реакций. J. Schneider с соавт. [36] показал, что АФДТ с метиленовым синим и облучением широкополосным белым светом (400–700 нм) в дозе 10 Дж/см² вызывает инактивацию РНК Q β -бактериофага *in vitro* посредством ее сшивки с плазматическими протеинами. Отмечается в некоторых случаях задержка роста бактериальной культуры *in vitro* при проведении АФДТ вызывается окислительным стрессом, что тоже может оказаться полезным при клиническом применении [18]. Способность бактериальной клетки *in vitro* выживать после окислительного стресса зависит от активности ее супероксиддисмутазы, как в случае со штаммами *E. coli* [18], или от количества и активности ее белков теплового шока, как в случае с микобактериями, в условиях окислительного стресса продуцирующими 2 типа белков теплового шока – HSP-70 и HSP-90 [50]. В этой связи представляет интерес комбинированное воздействие АФДТ на микобактерии туберкулеза *in vitro* с сульфированным фталоцианином алюминия (НИОПИК, Россия) и лазерного излучения с длиной волны 600–700 нм в дозе 20 Дж/см². Для исследования были использованы жизнеспособные культуры *M. tuberculosis*. Динамику роста культур оценивали по количеству и величине колоний каждые 10 дней в течение 60 дней. На 7-й день культуры подвергли воздействию ФДТ с сульфированным фталоцианином алюминия, гематопорфирином и некоторыми другими ФС. Результатом явилась отчетливая задержка роста колоний микобактерий. В контроле (только ФС и только лазерное воздействие) задержки роста колоний не наблюдали (рис. 1)

При АФДТ грамотрицательных бактерий, например *Pseudomonas aeruginosa*, фотодинамической инактивации могут подвергаться липополисахаридная оболочка бактерий и протеолитические ферменты. Результатом в данном случае является снижение устойчивости к антибактериальным препаратам и вирулентности. Так, N. Kometik с соавторами [23] показал, что проведение АФДТ *in vitro* с метиленовым синим и лазерным облучением в дозе 74,4 Дж/см² (гелий-неоновый лазер) позволяет значительно снизить активность протеаз синегнойной палочки и иммуногенность ее липополисахаридной оболочки. Инкубация подвергнутой такому варианту АФДТ синегнойной палочки с мононуклеарами периферической крови человека показала резкое снижение активности ее протеаз и иммуногенности липополисахаридов, выразившаяся в значительной редукции синтеза мононуклеарами провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , TNF- β). Инактивацию протеолитических ферментов *Porphyromonas gingivalis* методом АФДТ с

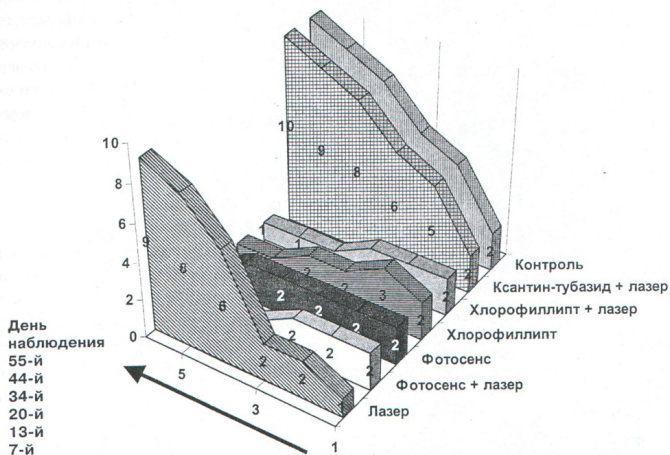


Рис. 1. Задержка роста колоний микобактерий туберкулеза при ФДТ с различными фотосенсибилизаторами.

метиленовым синим подтвердили исследования S. Packer [30]. Как показал А. Minnock с соавторами [28], АФДТ с цинкафталоцианинами способна повысить проницаемость клеточной оболочки кишечной палочки для протопорфирина IX, который в данном случае был использован для флюоресцентной диагностики. Исследование, подтверждающее изменение свойств грамположительной микрофлоры в виде реверсии устойчивости к антибиотикам [51*] проведено *in vivo* в Сибирском центре лазерной медицины по следующей методике. Стерильным тампоном производили забор материала из зева пациентов, высевали его на 5% кровяной агар и пересевали на среду Мюллера–Хинтона с аппликацией дисков с антибиотиками (С.-Петербург, НИЦФ) и оценкой результатов по NCLS (1998).

Фотосенсибилизатор фотосенс в количестве 3 мл 0,2% раствора вводили с помощью ультразвукового ингалятора в полость рта и зев пациентов 3 раза через 24 ч. После 3-й ингаляции на полость рта и зев воздействовали излучением лазера с длиной волны 650 нм; общая доза составляла – 2 Дж/см². На следующий день повторно брали мазки из зева и оценивали устойчивость микрофлоры к антибиотикам таким же методом. При повторном исследовании микрофлоры, представленной *S. aureus*, *S. haemolyticus* и *S. epidermidis*, обнаружили полное отсутствие роста золотистого и гемолитического стафилококков и реверсию устойчивости к антибактериальным препаратам *S. epidermidis*, выразившуюся в возникновении чувствительности к карбенициллину и эритромицину (рис. 2).

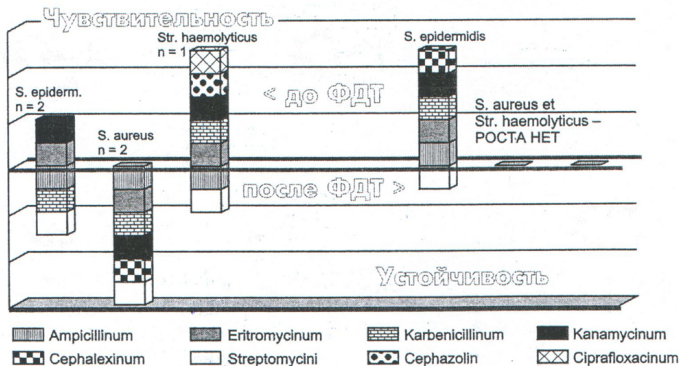


Рис. 2. Динамика роста и изменения утойчивости к антибактериальным препаратам некоторых микроорганизмов при АФДТ с препаратом Фотосенс *in vivo*.

Таким образом, АФДТ инфекционных заболеваний, вызванных бактериальными возбудителями, представляет собой процесс активного взаимодействия АФК и токсичных радикалов с антистрессорными факторами бактерий, исход которого могут быть различными в зависимости от интенсивности генерации АФК, активности антистрессорных протеинов, антиоксидантных ферментов бактерий, а *in vivo* – от персистенции возбудителя – внутри- или внеклеточно, клеточного микроокружения и многих других факторов. В некоторых случаях не исключено полное отсутствие эффекта (рис. 3).

Клиническая АФДТ сегодня находится «в детском возрасте» [49]. К ФДТ вирусов можно отнести сообщение М. Shikowitz с соавторами [37] о клиническом применении ФДТ с дигематопорфинами для лечения 41 больного с рецидивирующим папилломатозом гортани (с учетом того, что папилломатоз является клиническим проявлением папилломавирусной инфекции) Через 48 и 72 ч после внутривенного введения соответственно 3,25 и 4,25 мг/кг дигематопорфина больным была проведена эндоларингеальная ФДТ лазером с длиной волны излучения 630 нм в дозе 50 Дж. Трехлетнее наблюдение за больными показало хороший клинический эффект по сравнению с контрольной группой и отсутствие папилломавируса в гистологических препаратах [37]. По данным F. Wierrani [46], проведение ФДТ с аминолевулиновой кислотой больным с интраэпителиальными новообразованиями шейки матки в 80% случаев способствовала успешной эрадикации папилломавирусной инфекции этой области.

Другие области применения АФДТ представлены в основном в русскоязычных публикациях. Так, П. Толстых с соавторами [8] сообщил о высокой эффективности АФДТ гнойных

ран у животных (применение местных аппликаций сульфированного фталоцианина алюминия и красного некогерентного излучения). Наиболее раннее сообщение о возможности использования гематопорфиринов для лечения кожных инфекций – работа Ю. Алексеева с соавторами [1]. В ней исследована токсичность порфиринов при кожных аппликациях и сенсибилизации ультрафиолетовой лампой. С хорошим клиническим эффектом применена АФДТ (с сульфированным фталоцианином алюминия и внутрикавернозным облучением: длина волны 675 нм, доза 300 Дж/см²) в комплексном лечении прогрессирующего фиброзно-кавернозного туберкулеза в Сибирском центре лазерной медицины с участием автора [5]. Е.Ф. Странадко с соавторами [6] использовал АФДТ с сульфированным фталоцианином алюминия для лечения хронических гнойно-воспалительных заболеваний мягких тканей с хорошим клиническим эффектом.

Клинический эффект ФДТ при заболеваниях двенадцатиперстной кишки, ассоциированных с *Helicobacter pylori*, с применением дисульфированного фталоцианина алюминия («НИОПИК», Россия), достигнут в Сибирском центре лазерной медицины [2]. Использовали метод локальной эрадикации микробной флоры двенадцатиперстной кишки, предположение о перспективности которого было высказано S. Wown в 1998 г. [15]. Показана достаточная клиническая эффективность АФДТ с фотосенсом (сульфированный фталоцианин алюминия) при лечении гнойных язв у больных сахарным диабетом [7]. Представляется, что расширение области применения АФДТ является перспективой ближайшего будущего.

Антимикробная фотодинамическая терапия представляет одно из перспективных направле-

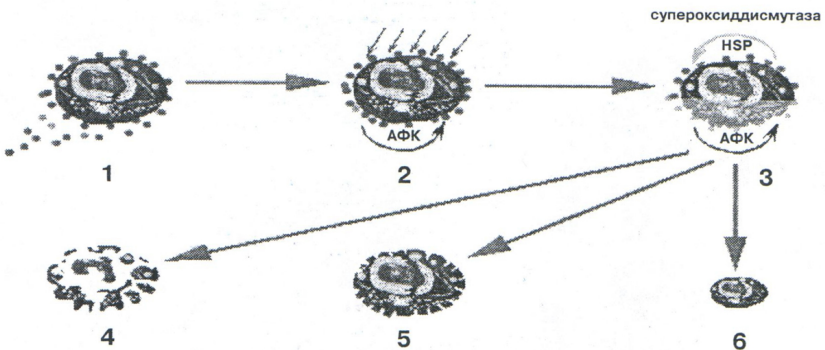


Рис. 3. Влияние АФДТ на бактериального возбудителя инфекционного заболевания:

1 – абсорбция ФС на поверхности бактериальной клетки; 2 – энергетическое воздействие, генерация ФС активных форм кислорода; 3 – оксидантный стресс. Повышение активности бактериальной супероксиддисмутазы или синтез белков теплового шока. В зависимости от способности бактерии «защититься» от оксидантного стресса исходом является: 4 – смерть; 5 – изменение оболочки или устойчивости к антибактериальному препарату; 6 – задержка роста колоний.

ний неонкологического применения ФДТ. Интерес к данному направлению обусловлен тем, что АФДТ «работает» по принципу естественной биологической антибактериальной защиты макроорганизма, т. е. через АФК или оксиды азота. Не исключено, что при дальнейшем развитии этого направления будет показано, что АФДТ способна вызывать не только чувствительность, но и устойчивость микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Тем не менее использование АФДТ как адьювантного метода в настоящее время представляется достаточно перспективным, особенно в комплексе с традиционной антибактериальной терапией, хирургическими методами и методами физического воздействия на возбудителей инфекционных заболеваний. Серьезные исследования механизмов действия АФДТ, как и исследования механизмов онкологической ФДТ, раскрывают важные особенности взаимодействия возбудителей инфекционных заболеваний и организма-хозяина, что уже сегодня положительно влияет на клиническую эффективность лечения некоторых инфекций. Ограниченное клиническое применение АФДТ в настоящее время обусловлено отсутствием серьезных доклинических и лабораторных исследований в этой области. Авторы данного обзора ставили своей целью расширение представления об АФДТ как о перспективном методе лечения инфекционных заболеваний.

Литература

- Алексеев Ю., Гладких С., Иванова И. и др. // Материалы 2-го Всероссий. симпозиума «Фотодинамическая терапия злокачественных новообразований». — М., 1997. — С. 142–144.
- Васильев Н.Е. // Лазерная медицина. — 1999. — Т. 3 (3–4). — С. 16–20.
- Волкова А., Лощенко В., Еришова Е. и др. Лазерные и информационные технологии в медицине XXI века / Материалы международной конференции. — СПб., 2001. — С. 414.
- Гельфонд Б.Р. // Инфекции и антимикробная терапия. — 2001. — Т. 3, № 3. — С. 3–4.
- Огуренко А., Денисов А., Васильев Н. и др. // Материалы 3-го Всероссий. симпозиума «Фотодинамическая терапия». — М., 1999. — С. 53–54.
- Странадко Е., Толстых П., Корабоев У. // Материалы 3-го Всероссий. симпозиума «Фотодинамическая терапия». — М., 1999. — С. 83–91.
- Толстых П., Корабоев У., Дуванский В. и др. // Материалы междунар. конф. «Лазерные и информационные технологии в медицине XXI века». — СПб., 2001. — С. 449–450.
- Толстых П., Корабоев У., Шехтер А. и др. // Лазерная медицина. — 2001. — № 5 (2). — С. 8–13.
- Яковлев С.В. // Инфекции и антимикробная терапия. — 2001. — Т. 3, № 3. — С. 6–7.
- Amyles S. // JAMA. — 2001. — Vol. 285, № 18. — P. 2317–2318.
- Bachmann B., Knuver-Hopf J., Lambrecht B. // J. med. Virology. — 1995. — Vol. 47. — P. 172–178.
- Bedvell J. et al. // The Lancet. — 1990. — Vol. 335, № 8700. — P. 1287.
- Bhatti M., MacRobert A. et al. // Antimicrob. Agents Chemother. — 2000. — Vol. 44, № 10. — P. 1615–1618.
- Bilski P., Ehrenshaft M., Daub M. et al. // Photochemistry and Photobiology. — 2000. — Vol. 71 (2). — P. 129–134.
- Bown S. // BMJ. — 1998. — Vol. 316. — P. 757.
- Capella M., Menezec S. // Int. J. Radiat. Biol. — 1992. — Vol. 62 (3). — P. 321–326.
- Devanathan S., Dahl T., Midden W. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1990. — Vol. 87. — P. 2980–2984.
- Dukan S., Nustrom T. // J. Biol. Chem. — 1999. — Vol. 274, № 37. — P. 26027–26032.
- Fendrick J., Hallick L. // J. invest. Derm. — 1984. — № 83 (Suppl. 1). — P. 96s–101s.
- Ferguson J. // Photochem. Photobiol. — 1995. — Vol. 62. — P. 954–958.
- Griffiths M. // J. antimicrob. Chemother. — 1997. — Vol. 40. — P. 873–876.
- Jackson Z., Meghji S., MacRobert A. M. // 1999. — Vol. 14. — Iss. 2. — P. 150–157.
- Komerik N., Wilson M., Poole S. // Photochem. Photobiol. — 2000. — Vol. 72 (5). — P. 676–680.
- Malik Z., Hanania J., Nitzan Y. // J. Photochem. Photobiol. B: Biology. — 1990. — Vol. 5. — P. 281–293.
- Milson C. // Lasers in Medical Science. — 1997. — Vol. 12, № 2. — P. 134–135.
- Milson C. et al. // Ann. Univ. College. — London: Medical School, 1998. — On-Line.
- Minnock A., Vernon D. I. et al. // J. Photochem. Photobiol. B: Biology. — 1996. — № 32 (3). — P. 159–164.
- Minnock A., Vernon D., Schofield J. et al. // Antimicrob. Agents Chemother. — 2000. — Vol. 44, № 3. — P. 522–527.
- Mohr H., Lambrecht B., Selz A. // Immunological investigation. — 1995. — Vol. 24. — P. 73–83.
- Packer S., Bhatti M., Burns T. et al. // Lasers in medical Science. — 2000. — Vol. 15. — Iss. 1. — P. 24–30.
- Raab O. // Z. Biol. — 1900. — Bd. 39. — S. 524–546.
- Radschweigt A., Ruttiger H., Nuhn P. et al. // Photochem. Photobiol. — 2001. — Vol. 73 (2). — P. 119–127.
- Rovaldi C., Pievsky A., Sole N. // Antimicrob. Agents Chemother. — 2000. — Vol. 44, № 12. — P. 3364–3367.
- Sauvaigo S., Douki T., Odin F. // Photochem. Photobiol. — 2001. — Vol. 73 (3) — P. 230–237.
- Stephenson J. // JAMA. — 2001. — Vol. 285, № 18. — P. 2317–2318.
- Schneider J., Quentin P., Floyd R. // Photochem. Photobiol. — 1999. — Vol. 70 (6). — P. 902–909.
- Shikowitz M., Abramson A., Freeman A. et al. // Laryngoscope. — 1998. — Vol. 108 (7). — P. 962–967.
- Stieber F., Brien J. et al. // Photochem. Photobiol. — 1987. — Vol. 46, № 5. — P. 707–711.
- Soukos N. et al. // Antimicrob. Agents Chemother. — 1998. — Vol. 42, № 10. — P. 2592–2601.
- Szoecs K., Gabor F., Csik G., Fidy J. // J. Photochem. Photobiol. B: Biology. — 1999. — № 50 (1). — P. 8–17.
- Usacheva M., Mattev C. et al. // Lasers in Surgery and Medicine. — 2001. — Vol. 29. — Iss. 2. — P. 165–173.
- Wagner S., Skripchenko A. // Transfusion. — 1998. — Vol. 38. — P. 729–737.
- Wainwright M., Phoenix D. et al. // J. Antimicrob. Chemother. — 1997. — Vol. 40. — P. 585–589.
- Wainwright M. // J. Antimicrob. Chemother. — 1998. — Vol. 42. — P. 13–28.
- Wandt H., Ehninger G., Michael W. et al. // Oncologist. — 2001. — № 6. — P. 450.
- Wierrani F. // Gynakologisch-geburtshilfliche Rundschau. — 1999. — Bd. 39, № 4. — S. 217–225.
- Wolfson H. et al. // Photodynamic therapy and biomedical lasers. Ed.: P. Spinelli. — M/Dal Fante dc Marchellini. — Amsterdam, 1992. — P. 281–285.
- Wolfson H. et al. 57-th Annual Meeting American College of Gastroenterology // Miami Beach, 1992.

49. Zeina B., Greeman J., Purcell W., Das B. // Brit. J. Derm. – 2001. – № 144 (2). – P. 274–278.
 50. Zigel U., Kaufmann S. // Clin. Microbiol. Rev. – 1999. – Vol. 12, № 1. – P. 19–39.
 51. * Результаты исследования находятся в печати в зарубежном издании.

Antimicrobial photodynamic therapy

N. Vassiliev, A. Ogirenko

Antimicrobial photodynamic therapy (APDT) is one of perspective directions of PDT-applications. The interest to the given direction is caused by that APDT «works» by a principle natural biological antibacterial host protection – that is through reactive oxygen species.

Use APDT as adjuvant method now is represented rather perspective, in particular in a complex with conventional antibacterial therapy, surgical methods and methods of physical effect. The researches of gears of action APDT open the important features of interaction of infection diseases and host, that already today positively influences clinical efficiency of treatment of some infections.

The limited clinical application APDT today is caused by absence serious pre-clinical and laboratory researches in this area. The authors of the given review put by the purpose expansion of representation about APDT as a perspective method of treatment of zymotic diseases.

УДК 57.085.23

Е.Ф. Странадко¹, М.В. Рябов¹, С.М. Терехов², А.С. Макаренков²,
Т.Д. Смирнова², Д.В. Яшунский³, Н.Э. Нифантьев^{3,4}

Методические особенности проведения экспериментальных исследований фотосенсибилизаторов в культуре клеток

¹ Государственный научный центр лазерной медицины Минздрава РФ, ² Медико-генетический научный центр РАМН, ³ Институт органической химии РАН, ⁴ Biolitec AG

Ключевые слова: фотосенсибилизатор, фотодинамическая терапия, культуры клеток, фотометрия, скрининг фотосенсибилизаторов

В доклинических испытаниях различных лекарственных препаратов все большее значение приобретают культивируемые клетки млекопитающих и особенно человека. Эти модели позволяют оценить влияние изучаемого препарата на жизнеспособность и пролиферацию клеток, а также на различные метаболические процессы. Применение для указанных целей клеточных культур человека уже нашло свое отражение в ряде международных и отечественных нормативных документов [3].

Для оценки пролиферации и гибели клеток в культуре в последнее время все шире применяются различные неизотопные методы, основанные на окрашивании клеток определенными красителями с последующей экстракцией красителя из клеток органическими сольвентами и определением его концентрации спектрофотометрически. Установлено наличие прямой корреляции между концентрацией красителя и количеством клеток, поэтому данный подход позволяет оценивать число клеток в исследуемом образце по показателю оптической плотности солюбилизованного из них красителя. Для измерения оптической плотности используют стандартный микропланшетный фотометр, с помощью которого можно одновременного определять количество клеток в 96 образцах. Это значительно упрощает и интенсифицирует скрининговые исследования по сравнению с традиционными изотопными методами [4, 9, 11].

Для фотометрической оценки пролиферации и гибели клеток в культуре предложено несколько методов окрашивания: кристаллическим фиолетовым (КФ), метиленовым синим, нейтральным красным, раствором Гимзы, МТТ {3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолил бромид} [5, 10]. Известно, что КФ и МТТ позволяют получать достоверные результаты при исследовании цитотоксического действия различных агентов, включающих противоопухолевые химиопрепараты [1, 2, 4].

В последние годы широкое распространение получил новый метод лечения злокачественных новообразований и ряда неопухолевых заболеваний – фотодинамическая терапия (ФДТ). Развитие этого направления в медицине связано в первую очередь с разработкой новых препаратов – фотосенсибилизаторов. Появление соединений, обладающих фотосенсибилизирующими свойствами, требует разработки методик скрининга их цитотоксической активности, в первую очередь скрининга тестов для определения темновой токсичности и фототоксичности фотосенсибилизаторов *in vitro*. В мировой практике при постановке подобных исследований применяют как изотопные методы оценки пролиферации и гибели клеток [6, 7], так и неизотопные, в первую очередь МТТ-тест с окрашиванием препаратов через 24 ч после светового воздействия [7, 8, 12].

Цель работы – изучение особенностей применения различных методик оценки пролиферации