

## ВЫБОР ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА И ПАРАМЕТРОВ СВЕТООВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ЭНДОСКОПИЧЕСКОЙ ЭНДОБРОНХИАЛЬНОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Проф. В. В. БОЙКО, д-р мед. наук А. Г. КРАСНОЯРУЖСКИЙ, В. В. КРИЦАК

ГУ «Институт общей и неотложной хирургии имени В. Т. Зайцева НАМН Украины»,  
Харьков, Украина

**Показано, что в основе фотодинамической терапии лежит приведение фотосенсибилизаторов в возбужденное состояние световым излучением, исходя из чего совпадение спектральных характеристик применяемых соединений и источников излучения является необходимым условием реализации принципа данного метода. Проведен мониторинг спектров оптического поглощения антисептиков, которые наиболее часто используются в медицинской практике, имеют собственную окраску, и пики их оптического поглощения лежат в области видимого и ближнего инфракрасного спектральных диапазонов.**

*Ключевые слова:* фотодинамическая терапия, антисептики-фотосенсибилизаторы, антибактериальная активность.

Значение послеоперационных осложнений в торакальной хирургии велико, поскольку они являются причиной летальных исходов, удлиняют сроки лечения, приводят к инвалидности пациентов [1]. Наиболее тяжелые и опасные осложнения при хирургическом лечении рака легкого — бронхоплевральные, к которым относятся несостоятельность культи бронха, бронхиальный свищ с развитием эмпиемы плевральной полости, диффузный гнойный эндобронхит [2, 3]. По мнению разных авторов, представленные осложнения составляют в общей структуре послеоперационных осложнений 3–12% [1, 4]. Одна из причин их возникновения — обтурация дыхательных путей слизью, мокротой, сгустками крови, что происходит, по данным литературы, в от 4–5 до 20–35% случаев [2, 5, 6].

Несмотря на совершенствование методик оперирования и предоперационной подготовки пациентов, непосредственные результаты радикальных операций по поводу рака легкого остаются неудовлетворительными [7].

Послеоперационные эндобронхиальные осложнения у больных раком легкого протекают тяжело, представляют большие трудности при лечении и значительно ухудшают качество жизни пациентов [8, 9].

Воспалительный процесс в слизистой бронхиального дерева обычно сопровождается отеком и гиперемией слизистой оболочки, снижением ее эластичности, контактной кровоточивостью и наличием мокроты в просвете бронхиального дерева. При этом происходит ухудшение дренажной функции мерцательного эпителия с нарушением микроциркуляции и накоплением густого бронхиального секрета [9].

К разряду высокоэффективных, разноплановых и безопасных способов лечения целого ряда

болезней человека, в том числе торакальной патологии, относится низкоэнергетическое лазерное излучение. Ранее использовались его противовоспалительные, противоотечные, иммуномодулирующие свойства [2–7].

Фотодинамическая антимикробная терапия (ФДТ) — это способ инактивации микробных клеток при помощи фотосенсибилизатора и источника излучения с соответствующей длиной волны.

В настоящее время интерес к изучению проблемы фотодинамического влияния на патогенную микрофлору возродился уже на значительно более высоком научно-методическом уровне [3].

Использование ФДТ для уничтожения патогенных микроорганизмов имеет большой медицинский и технологический потенциал. В лечении гнойной инфекции такая терапия обладает рядом преимуществ перед традиционными антибактериальными методами [7–9]:

- эффективность ФДТ не зависит от спектра чувствительности патогенных микроорганизмов к антибиотикам, она оказывает губительное влияние на антибиотикорезистентные штаммы золотистого стафилококка, синегнойной палочки и др.;

- развитие резистентности микроорганизмов к действию ФДТ маловероятно, потому что фотодинамическое повреждение обусловлено цитотоксическим действием синглетного кислорода и свободных радикалов;

- применяемые в клинике фотосенсибилизаторы нетоксичны (сами по себе, без света они не действуют) и не обладают мутагенным действием. Это сводит на нет вероятность селекции фоторезистентных штаммов микроорганизмов;

- противомикробное действие ФДТ не снижается при длительном лечении хронических локальных инфекционных процессов;

— бактерицидный эффект ФДТ носит локальный характер, он не оказывает системного губительного воздействия на сапрофитную микрофлору организма. Это обусловлено тем, что составным компонентам ФДТ — фотосенсибилизатору и низкоинтенсивному лазерному излучению — не свойственно системное бактерицидное действие или другие побочные эффекты.

Поскольку в основе ФДТ лежит приведение фотосенсибилизаторов в возбужденное состояние световым излучением, то совпадение спектральных характеристик применяемых соединений и источников излучения является необходимым условием реализации принципа данного метода [1].

В то же время литературные данные о спектральных характеристиках наиболее распространенных антисептиков-фотосенсибилизаторов содержат разночтения, обусловленные влиянием молекулярного окружения, в первую очередь растворителя, на абсорбционные свойства хромофоров [3]. Иными словами, применение потенциальных антисептиков-фотосенсибилизаторов, превращающее их исходный антибактериальный эффект, возможно лишь при совпадении их спектра поглощения и диапазона используемого источника излучения.

С целью выявления наиболее перспективных для ФДТ антисептиков-фотосенсибилизаторов нами был проведен мониторинг спектров оптического поглощения антисептиков, которые наиболее часто используются в медицинской практике, имеют собственную окраску и пики их оптического поглощения лежат в области видимого и ближнего инфракрасного спектральных диапазонов.

Исследовались водные растворы: метиленового синего, генцианвиолета, фуксина, бриллиантового зеленого, а также раствор эозина, толлуидинового синего, фурацилина в разведении 1:5000, диоксида, йодидирина. Спектрофотометрические исследования (определение коэффициента оптического пропускания и выявление пиков оптического поглощения) предложенных растворов проводились на спектрофотометре СФ-56 («ЛОМО», РФ) в спектральном диапазоне от 190 до 1100 нм. Для определения длины волны, на которой происходит максимальное светопоглощение, концентрация веществ с интенсивной окраской была доведена до 0,01. В основу измерения величины спектропропускания положен принцип уравнивания интенсивности двух световых модулированных потоков. Как известно, коэффициент светопропускания среды определяется отношением величины светового потока излучения, вышедшего из среды, к величине светового потока излучения той же длины волны, вошедшего в среду. Был изучен антибактериальный эффект ФДТ в отношении одного из основных возбудителей острого и хронического гнойного воспаления трахеобронхиального дерева — *Staphylococcus aureus*. Учитывая высокую вирулентность золотистого стафилококка и частоту встречаемости (по нашим данным, более 14% при

острых и 34% при хронических процессах), в качестве объекта исследования был выбран штамм *S. aureus*, обладающий выраженной плазмокоагулирующей и лецитиназной активностью.

Изучение физических характеристик остальных красителей позволило выбрать источники излучения с полосой генерации, совпадающей с полосами поглощения исследуемых красителей.

По результатам наших исследований установлено, что у метиленового синего есть три зоны максимального поглощения — в ультрафиолетовой (200–320 нм), зеленой (390–430 нм) и красной (530–700 нм) областях спектра. У толлуидинового синего диапазон максимального поглощения приходится на красную часть спектра (600–630 нм), у бриллиантового зеленого максимально «поглощающей» является также красная область (580–670 нм) и узкая зона ультрафиолета (280–300 нм). Пики поглощения всех исследуемых веществ расположены в видимой части спектра и не выходят в область инфракрасного излучения.

Растворы фурацилина, диоксида «прозрачны» для светового излучения в зоне, расположенной в видимой и ближней инфракрасной части спектральных диапазонов. Пик оптического поглощения находится в небольшой зоне ультрафиолета. Эти вещества не могут использоваться как фотосенсибилизаторы, возможно, только в сочетании с другими красителями в качестве растворителя.

Мы поставили задачу подобрать оптимальные параметры светового излучения и концентрацию красителя, при воздействии которых не будут повреждаться здоровые ткани, но будет достигнут антибактериальный эффект.

Непосредственно перед исследованием готовится суспензия культуры *S. aureus* в концентрации  $1 \times 10^{10}$  м. т./мл в 1%-ном сахарном бульоне. Концентрацию микробной суспензии мы определяли с помощью фотоэлектрокалориметра (КФК-2) в 10-миллиметровых кюветах при длине волны 540 нм. Эксперименты проводили на 24-часовой культуре этого штамма, выращенной на желточно-солевом агаре (для учета лецитиназной активности микроорганизмов).

Использовались такие красители: толлуидиновый синий, бриллиантовый зеленый, генцианвиолет, метиленовый синий, эозин. Из исходных 1%-ных водных растворов каждого красителя получали 0,2; 0,04; 0,02 и 0,01 %-ные растворы путем разбавления сахарным бульоном. Затем к 2,8 мл раствора красителя соответствующей концентрации добавляли 0,2 мл суспензии микроорганизмов.

Время экспозиции в условиях термостата ( $t_0 = 37^\circ\text{C}$ ) — 15, 30, 60 мин и 24 ч. По истечении соответствующего времени инкубации с красителями 1,0 мл суспензии высевали на плотную питательную среду (желточно-солевой агар) и помещали в термостат на 24 ч для изучения ростовых свойств микроорганизма. Количество выросших колоний *S. aureus* выражали в степени (0, I, II, III, IV) колонийобразующих единиц

(КОЕ): 0 — отсутствие роста; I — очень скудный (до 10 КОЕ); II — скудный (10–25 КОЕ); III — умеренный (множество сосчитываемых колоний, но не более 50 КОЕ); IV — обильный (сплошной рост несосчитываемых колоний).

В результате серии экспериментов было установлено, что при воздействии толлуидинового синего на золотистый стафилококк в концентрациях 0,01–0,2% наблюдается IV степень роста *S. aureus*, что совпадает с контрольным высевом культуры. Лишь 1%-ный раствор красителя обладает слабым бактериостатическим действием в отношении *S. aureus* — при 15-минутной экспозиции с красителем наблюдался умеренный рост (III степень) микроорганизма. С увеличением экспозиции усиления антибактериальной активности красителя толлуидинового синего мы не наблюдали. Лецитиназная активность стафилококка отмечалась в течение всего эксперимента.

По результатам исследования воздействия красителя эозина на ростовые свойства *S. aureus* видно, что его антибактериальное свойство проявлялось при концентрации 0,2%-ного водного раствора и выражалось умеренным (III степень) ростом золотистого стафилококка при сохранении лецитиназной активности возбудителя. При 1%-ной концентрации красителя рост стафилококка уменьшался до II степени и лишь при суточной экспозиции данного раствора с возбудителем был замечен его скудный рост. Таким образом, было установлено, что водный раствор эозина обладает низкой антибактериальной активностью в отношении штамма *S. aureus* в концентрациях 0,01–0,2%.

При исследовании метиленового синего было выявлено, что при экспозиции более часа в концентрации 0,2% водного раствора краситель обладает антибактериальным действием. Наблюдались рост единичных колоний возбудителя и снижение его лецитиназной активности. Максимальный антибактериальный эффект отмечается у 1%-ного раствора метиленового синего при экспозиции один час и более, лецитиназная активность при этом имеет тенденцию к снижению. В результате исследования антибактериальной активности водных растворов метиленового синего в отношении золотистого стафилококка была установлена его высокая бактериостатическая активность. Краситель метиленовый синий обладает также умеренной антибактериальной активностью. При воздействии 1%-ного водного раствора на золотистый стафилококк при инкубации 15 мин наблюдаются снижение лецитиназной активности и бактериостатический эффект, который проявляется скудным ростом микроорганизмов.

Изучалось влияние светового излучения различных длин волн на ростовые свойства *S. aureus*. Использовался ультрафиолетовый ( $\lambda = 0,25 \div 0,45$  мкм), красный ( $\lambda = 0,59 \div 0,76$  мкм), зеленый ( $\lambda = 0,49 \div 0,56$  мкм), синий ( $\lambda = 0,45 \div 0,49$  мкм) светодиодные излучатели, а также излучение гелий-неонового лазера аппарата АФЛ-2 ( $\lambda = 0,63$  мкм)

(ООО «Львов-электроника», Украина). В результате воздействия ультрафиолетового, синего, зеленого, красного светодиодного излучений на ростовые свойства золотистого стафилококка было установлено полное отсутствие антибактериального эффекта в дозах излучения от 0,1 до 1,0 Дж. Нами проведено сравнение степени антибактериального действия светодиодного и лазерного излучения красной части спектрального диапазона при одинаковых дозах. Статистически достоверного различия в степени антибактериального действия не было. При дозе облучения 0,1–0,3 Дж антибактериальный эффект не наблюдался, в дозе 0,5–3,6 Дж отмечалось незначительное снижение роста *S. aureus* до III степени, лецитиназная активность сохранялась. Таким образом, проведенные исследования указывают на отсутствие антибактериального эффекта в отношении *S. aureus* у лазерного и светодиодного светового излучений видимой части спектрального диапазона в указанных дозах.

Выяснялось наличие фотодинамического эффекта при комбинированном воздействии излучаемых красителей и светового излучения (светодиодного и лазерного). Известно, что фотодинамический эффект в клетках возникает за счет образования синглетного кислорода и других высокорективных окислителей, в процессе фотохимической реакции микробная клетка разрушается изнутри, не повреждая при этом здоровых тканей.

Изучено влияние ультрафиолетового ( $\lambda = 0,25 \div 0,45$  мкм), синего ( $\lambda = 0,45 \div 0,49$  мкм), зеленого ( $\lambda = 0,49 \div 0,56$  мкм), красного ( $\lambda = 0,59 \div 0,76$  мкм) светодиодного излучений на ростовые свойства *S. aureus* при равных условиях (температурный режим, pH среды, освещенность). Отмечается наличие антибактериального эффекта при сочетанном воздействии генцианвиолета и светодиодного (зеленого, красного, синего спектров) и лазерного излучения (красного спектра) при времени инкубации с красителем 15 мин, концентрации красителя 0,04%, дозе излучения 0,1–7,2 Дж.

Результат свидетельствовал о высокой антимикробной активности самого красителя — генцианвиолета ( $p > 0,05$ ). При комбинированном воздействии красителя и ультрафиолетового излучения наблюдалось повышение антимикробной активности при инкубации 15 мин, концентрации 0,02%, дозе облучения 0,1 Дж, отмечался рост стафилококка I степени с положительной лецитиназной активностью, при более высоких концентрациях он отсутствовал. Данный факт позволяет предположить отсутствие фотодинамического эффекта при комбинированном воздействии красителя и излучения видимой части спектрального диапазона.

В результате изучения комбинированного воздействия 0,2–1,0%-ного раствора толлуидинового синего и светового излучения видимой части спектрального диапазона при дозе облучения 0,1–0,5 Дж установлено уменьшение роста золотистого

стафилококка по сравнению с первым опытом до I–II степени. Таким образом, фотодинамического эффекта с красителем толлуидиновым синим при данных дозах светового излучения получено не было ( $p > 0,05$ ).

Исследование комбинированного воздействия раствора метиленового синего и светового излучения ультрафиолетовой, красной, синей, зеленой частей спектрального диапазона показало усиление антибактериальной активности. По сравнению с результатами изучения воздействия на *S. aureus* 0,04%-ного водного раствора метиленового синего степень обсемененности снизилась с IV до II, в последующем — до единичных колоний. Лецитиназная активность золотистого стафилококка имела тенденцию к снижению. Полное отсутствие роста наблюдалось при дозе излучения 3,6 Дж и концентрации красителя 0,2–1,0% ( $p < 0,05$ ), а также при дозе излучения 7,2 Дж в концентрации водного раствора метиленового синего 0,04–1,0% ( $p < 0,001$ ).

Полученные данные позволяют предположить наличие фотодинамического эффекта при комбинированном воздействии водного раствора метиленового синего и светового излучения видимой части спектрального диапазона, а также

при влиянии ультрафиолета. При воздействии лазерного излучения красной части спектрального диапазона и красителя эозина отмечена тенденция к снижению роста золотистого стафилококка до I степени, но полного отсутствия роста не наблюдалось независимо от выбранных концентраций водного раствора.

Таким образом, наиболее выраженный фотодинамический эффект был установлен при комбинированном воздействии метиленового синего со световым излучением видимой части спектрального диапазона и ультрафиолетом. Для разработки метода лечения воспалительных заболеваний трахеобронхиального дерева у пациентов с патологией легких путем использования эндоскопической фотодинамической бронхоскопии было выбрано лазерное излучение красной части спектрального диапазона. Лазерное излучение обладает когерентностью, которая позволяет направлять его по световодам, что невозможно при светодиодном излучении данной мощности. Из красителей мы выбрали метиленовый синий как наиболее эффективный. Дальнейшие исследования позволят выявить наиболее перспективные для ФДТ антисептики-фотосенсибилизаторы.

#### Список литературы

1. Назарова Л. С. Дооперационное состояние функции внешнего дыхания и послеоперационные осложнения у больных раком легкого / Л. С. Назарова, Л. И. Волкова, С. А. Тузиков // Материалы X межрегиональной конференции онкологов.— Якутск, 2006.— С. 59–62.
2. Васильев Н. Е. Антимикробная фотодинамическая терапия / Н. Е. Васильев, А. П. Огиренко // Лазерная медицина.— 2002.— Т. 6, № 4.— С. 32–38.
3. Зильбер А. П. Этюды респираторной медицины / А. П. Зильбер.— М.: МЕД пресс-информ, 2007.— 792 с.
4. Lung cancer treated surgically in patients < 50 years of age / Н. Minami, М. Yoshimura, Н. Matsuoka, S. Toshihiko // Chest.— 2000.— Vol. 120.— P. 32–36.
5. Занько Н. Г. Физиология человека. Методы исследования функций организма: лабораторный практикум / Н. Г. Занько.— СПб.: СПбГЛТА, 2003.— 36 с.
6. Berghmans T. A prospective study of infections in lung cancer patients admitted to the hospital / T. Berghmans, J. P. Sculier, J. Klastersky // Chest.— 2003.— Vol. 124.— P. 114–120.
7. Павлова Е. В. Бронхоскопия при операциях на легких / Е. В. Павлова, О. П. Собещук // Чувствительность — устойчивость стафилококков к антисептическим препаратам / О. П. Собещук, А. А. Адарченко, А. П. Красильников // Здоровоохранение (Беларусь).— 1996.— М. В. Б.— С. 13.
8. Войтенко Н. К. К вопросу о влиянии лазерного излучения низкой интенсивности на микрофлору ран / Н. К. Войтенко, З. Хадра, В. М. Зильбер // Вестн. хирургии.— 1984.— № 4.— С. 54–56.
9. Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria / M. Hamblin, D. O'Donnell, N. Marthy [et al.] // J. of Antimicrobial Chemotherapy.— 2002.— Vol. 13, № 49.— P. 941–951.

### ВИБІР ФОТОСЕНСИБІЛІЗАТОРА ТА ПАРАМЕТРІВ СВІТЛОВОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ЕНДОСКОПІЧНОЇ ЕНДОБРОНХІАЛЬНОЇ ФОТОДИНАМІЧНОЇ ТЕРАПІЇ

В. В. БОЙКО, А. Г. КРАСНОЯРУЖСЬКИЙ, В. В. КРІЦАК

Показано, що в основі фотодинамічної терапії лежить приведення фотосенсибілізаторів у збуджений стан світловим випромінюванням, виходячи з чого збіг спектральних характеристик застосованих сполук і джерел випромінювання є необхідною умовою реалізації принципу цього методу. Проведено моніторинг спектрів оптичного поглинання антисептиків, які найчастіше використовуються в медичній практиці, мають власне забарвлення, і піки їх оптичного поглинання лежать у ділянці видимого та ближнього інфрачервоного спектральних діапазонів.

Ключові слова: фотодинамічна терапія, антисептики-фотосенсибілізатори, антибактеріальна активність.

**THE CHOICE OF PHOTOSENSITIZER AND LIGHT PARAMETERS FOR ENDOBRONCHIAL  
ENDOSCOPIC PHOTODYNAMIC THERAPY**

V. V. BOIKO, A. G. KRASNOIARUZHSKYI, V. V. KRITSAK

**It is shown that photodynamic therapy is based on light excitation of photosensitizers, therefore coincidence of the spectral characteristics of the used compounds and radiation sources is a prerequisite for implementation of the principle of this method. The optical absorption spectra of anti-septics, which are most commonly used in medical practice, have their own color, and absorbance peaks in the visible and near infrared spectral bands, were monitored.**

*Key words: photodynamic therapy, antiseptic photosensitizers, antibacterial activity.*

Поступила 21.02.2017

---