

ТЕХНОЛОГИИ АНТИМИКРОБНОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ, ОСНОВАННЫЕ НА СЕНСИБИЛИЗИРУЮЩЕМ ДЕЙСТВИИ АНТИСЕПТИКОВ-ПРОИЗВОДНЫХ НИТРОФУРАНА

**Плавский В.Ю.¹, Плавская Л.Г.¹, Дудчик Н.В.², Емельянова О.А.²,
Дудинова О.Н.¹, Сысов В.А.¹, Третьякова А.И.¹, Микулич А.В.¹,
Ананич Т.С.¹, Собчук А.Н.¹, Нагорный Р.К.¹, Леусенко И.А.¹,
Еременко Ю.Е.³, Малец Е.Л.³, Куприянова А.А.³,
Журневич В.И.³, Сердюченко Н.С.¹**

¹Институт физики НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

²Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены», г. Минск, Республика Беларусь

³Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр оториноларингологии»,
г. Минск, Республика Беларусь

e-mail: v.plavskii@ifanbel.bas-net.by

Введение

Эффективность инактивации микробных клеток оптическим излучением видимой области спектра может быть значительно увеличена за счет сенсбилизации микробных клеток экзогенными соединениями, обладающими фотодинамическими свойствами. Однако, главная проблема, при проведении процедур антимикробной фотодинамической терапии, состоит в отсутствии доступных, официально разрешенных для применения, фотосенсибилизаторов для реализации методов антимикробной фотодинамической терапии.

Наиболее возможным способом реализации эффективных технологий лазерной фотодинамической терапии воспалительных заболеваний ЛОР-органов и их гнойно-септических осложнений в клинической практике является применение указанной технологии с использованием в качестве фотосенсибилизаторов лекарственных препаратов (прежде всего отечественного производства), разрешенных к применению в медицинской практике и обладающих фотосенсибилизирующими свойствами. В качестве указанных препаратов могут выступать антисептики – производные нитрофурана: Фурацилин и Фурасол.

Цель работы

Исследовать фотофизические и фотосенсибилизирующие свойства антисептических препаратов – производных нитрофурана (Фурацилина и Фурасола), а также разработать технологии фотодинамической терапии гнойно-воспалительных заболеваний ЛОР-органов.

Материалы и методы

Объекты исследования

- ❑ Бактериальные культуры: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus haemolyticus* (клинический изолят) и дрожжеподобные грибы *Candida albicans* (ATCC 10231)
- ❑ Антисептики: производные нитрофурана – лекарственные препараты Фурасол и Фурацилин

Фотофизические свойства антисептиков-производных нитрофурана

- ❑ Абсорбционные исследования (спектрофотометр UV-VIS PB 2201 (Солар, Республика Беларусь))
- ❑ Флуоресцентные исследования (спектрофлуориметр Fluorolog-3 (Horiba Jobin Yvon Inc., Франция))

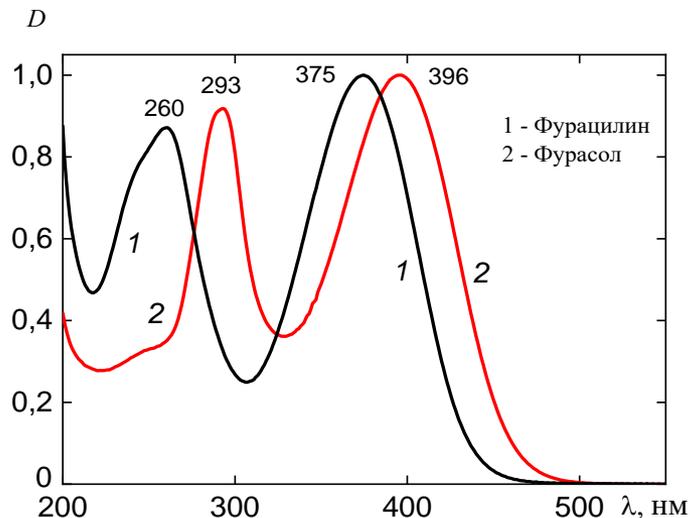
Эффективность генерации синглетного кислорода антисептиками. Фотохимическая устойчивость препаратов.

- ❑ Прямое измерение интенсивности люминесценции синглетного кислорода в области $\lambda = 1270$ нм
- ❑ Возбуждение образцов осуществлялось лазерными импульсами с длительностью 15 нс и энергией около 10 мкДж, следующими с частотой 15 Гц на длине волны 355 нм (третья гармоника Nd:YAG-лазера LS-2134, JV LOTIS TII, Республика Беларусь).
- ❑ Квантовые выходы фотосенсибилизированного образования синглетного кислорода определялись относительным методом. В качестве стандарта использовались водный раствор 5,10,15,20 tetrakis(N-methyl-4-pyridyl)-21H,23H-porphine (TMPyP), для которого $\phi\Delta = 77 \pm 4$ %.
- ❑ Фотохимическая стабильность антисептиков фурацилина и фурасола исследовали при воздействии непрерывного лазерного излучения с длиной волны 405 нм (плотность мощности на уровне поверхности раствора составляла 50 мВт/см², время облучения - 1-20 мин.) Для выяснения механизма фотохимических процессов, лежащих в основе фотодеструкции фотосенсибилизаторов, использовались добавки – тушители активных форм кислорода и радикальных процессов: азид натрия – тушитель синглетного кислорода; аскорбиновая кислота – универсальный донор/акцептор электрона; пируват натрия – тушитель перекиси водорода H₂O₂.

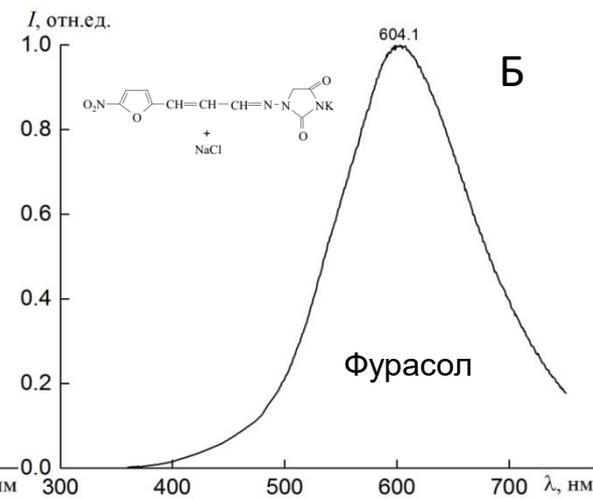
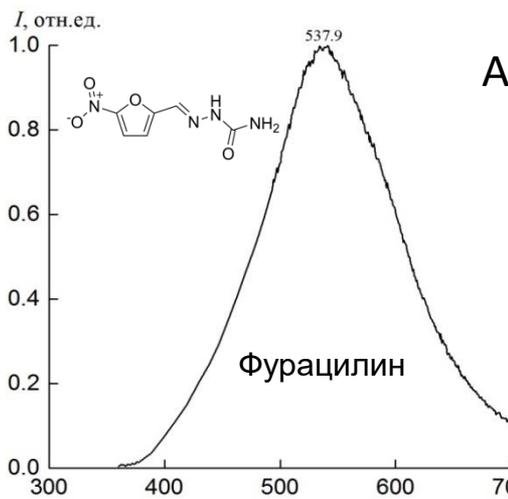
Фотодинамическое действие препаратов

- ❑ По 0,1 мл взвеси облученных (опытный вариант) и интактных (контрольный вариант) образцов бактерий высевали в чашки Петри диаметром 90 мм с питательной средой. Затем микроорганизмы инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 24 ч. Оценку жизнеспособности микроорганизмов в опытных (N_t) и контрольных (N_0) группах проводили путем подсчета числа выросших колоний на поверхности плотной питательной среды (определение числа колониобразующих единиц, КОЕ). Эффект фотоинактивации характеризовали величиной $N_t/N_0 \times 100$ %.

Фотофизические свойства антисептиков-производных нитрофурана

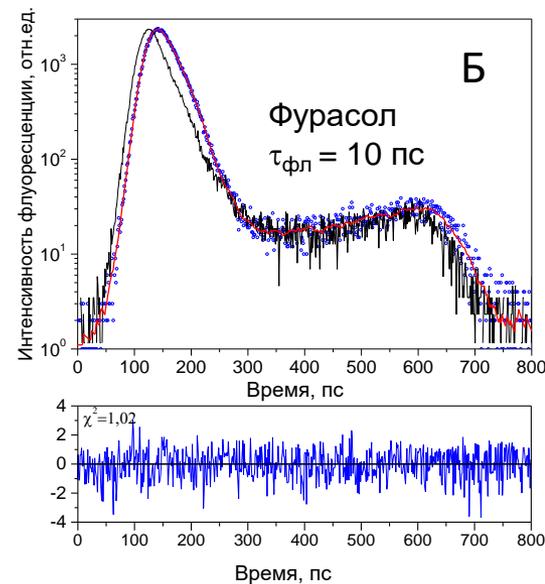
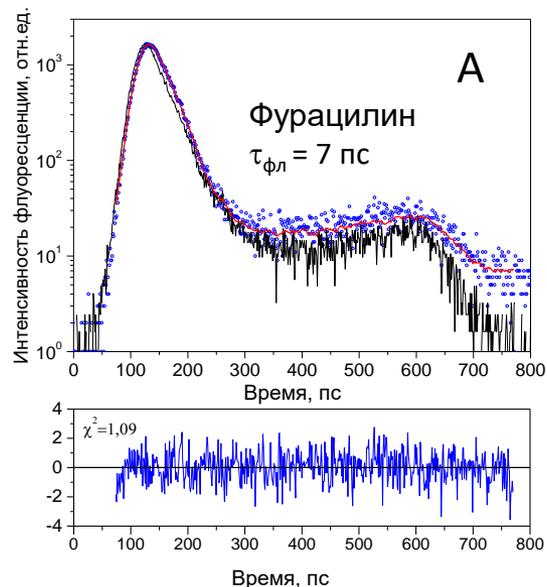


Спектры поглощения водных растворов Фурацилина и Фурасола: 1 – Фурацилин; 2 - Фурасол



Спектры флуоресценции водных растворов Фурацилина (А) и Фурасола (Б). Длина волны возбуждения – $\lambda_{\text{возб.}} = 350 \text{ нм}$.

Кинетики затухания флуоресценции лекарственных препаратов фурацилина (А) и фурасола (Б): экспериментально измеренная кинетика затухания флуоресценции Фурацилина на длине волны 538 нм (○○○) (А) и Фурасола на длине волны 604 нм (○○○) (Б), восстановленная кинетика затухания 1 – экспоненциальным методом деконволюции импульса флуоресценции (—), аппаратная функция, измеренная на длине волны 405 нм (—). На нижней вставке приведен график остаточных взвешенных отклонений.

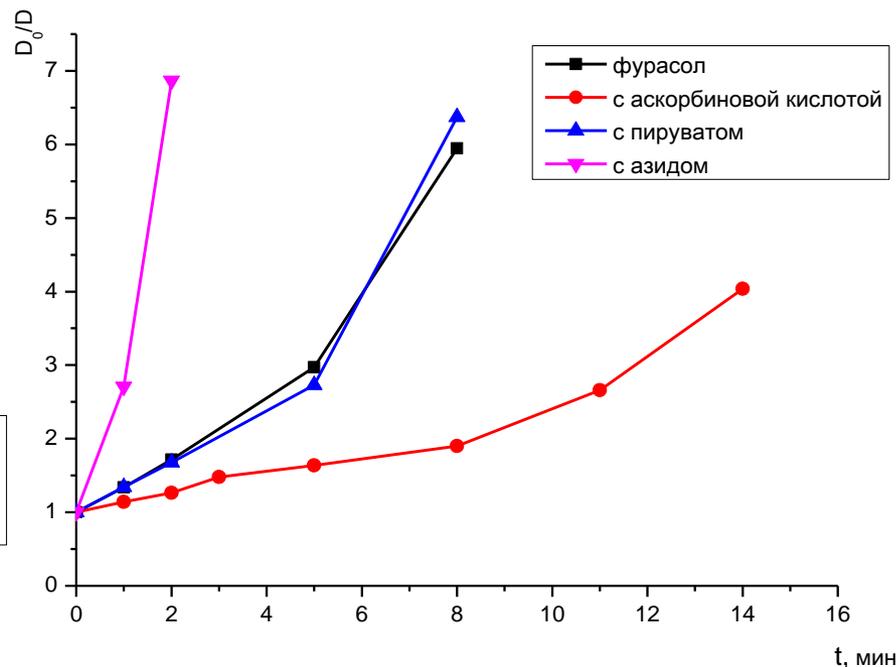
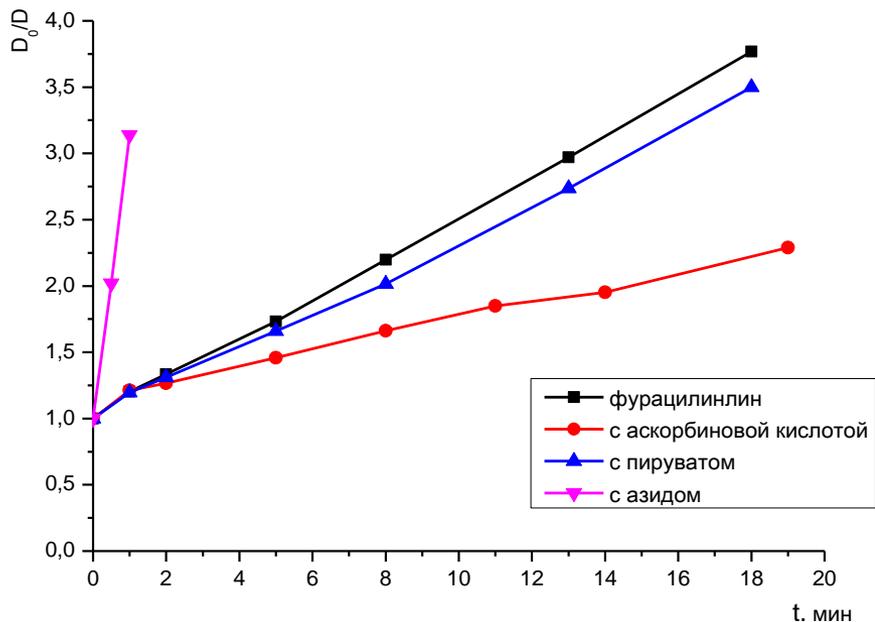


Эффективность генерации синглетного кислорода антисептиками-производными нитрофурана. Фотохимическая устойчивость препаратов.

- Лекарственные препараты Фурацилин и Фурасол при возбуждении оптическим излучением способны генерировать синглетный кислород.
- Наряду со способностью к генерации активных форм кислорода, указанные соединения при воздействии света могут инициировать протекание радикальных процессов (процессов типа I)
- Лекарственный препарат Фурасол при одинаковых параметрах оптического излучения обладает более высокой (по сравнению с фурацилином) фотохимической устойчивостью.

Квантовый выход генерации синглетного кислорода для лекарственных препаратов Фурацилин и Фурасол составляет $\phi_{\Delta} = 0,10$

Влияние $1 \cdot 10^{-2}$ М азидов натрия, аскорбиновой кислоты и пирувата натрия на кинетику фотодеструкции Фурацилина и Фурасола лазерным излучением с длиной волны 405 нм плотностью мощности 50 мВт/см², контролируемая по снижению оптической плотности в области максимума поглощения антисептиков - Фурацилина ($\lambda = 396$ нм) и Фурасола ($\lambda = 375$ нм)



Фотодинамическая инактивация бактериальных культур, сенсibilизированных антисептиками – производными нитрофурана

➤ Лекарственные препараты Фурацилин и Фурасол при возбуждении оптическим излучением обеспечивают эффективную фотодеструкцию патогенных микроорганизмов

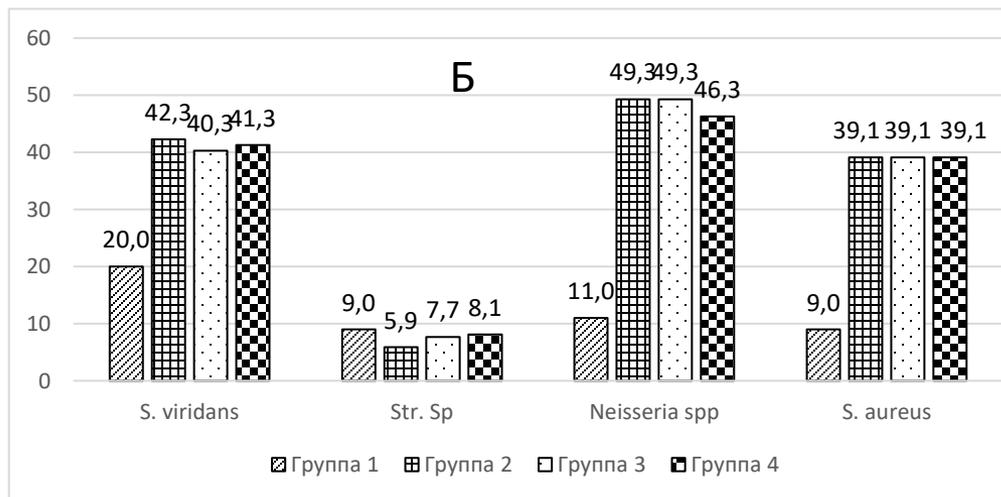
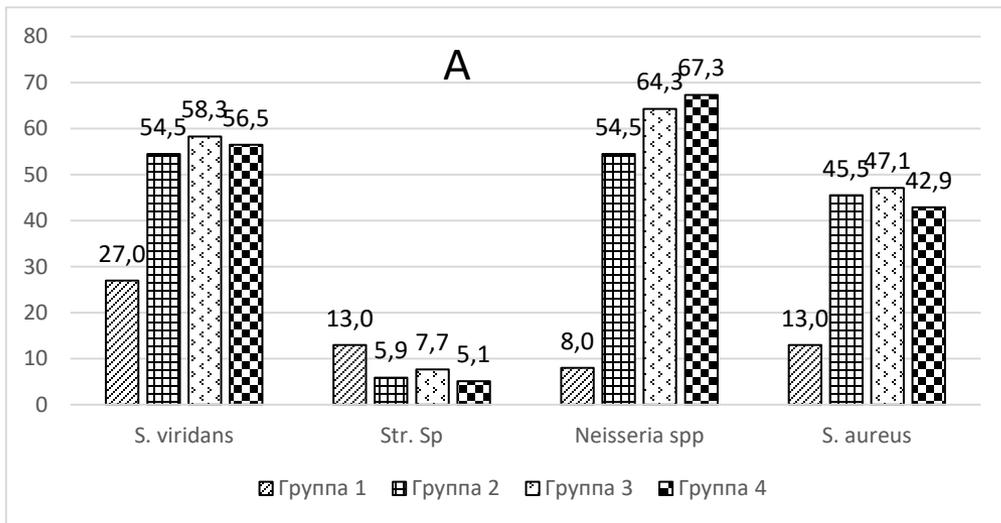
Фотодинамическая инактивация бактериальных культур *S. aureus* (ATCC 6538), *S. haemolyticus* (клинический изолят) и дрожжеподобных грибов *C. albicans* (ATCC 10231) в 0,9 % растворе хлористого натрия импульсным лазерным излучением с длиной волны $\lambda = 405$ нм, плотностью мощности $I = 20$ мВт/см² в присутствии Фурацилина и Фурасола (время облучения $t = 10$ мин)

	Среднее значение КОЕ, 10 ⁶		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>C. albicans</i>
Контроль	193	86	122
Фурацилин	49	16	115
Фурацилин+405 нм	0	1	0

	Среднее значение КОЕ, 10 ⁶		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>C. albicans</i>
Контроль	193	86	122
Фурасол	28	34	115
Фурасол+405 нм	0	0	0

Разработка технологии фотодинамической терапии гнойно-воспалительных заболеваний ЛОР-органов (клинические исследования)

Результаты исследования микрофлоры слизистой оболочки небных миндалин у пациентов различных групп до прохождения (А) и после прохождения (Б) курса фотодинамической терапии (длина волны лазерного излучения $\lambda = 405$ нм, плотность мощности $I = 10$ мВт/см², время воздействия – 6 минут, количество сеансов - 10)



Группа 1 - 56 пациентов (19 мужчин и 37 женщин), фотосенсибилизаторы - эндогенные порфириновые фотосенсибилизаторы, локализованные в патогенной микрофлоре небных миндалин.

Группа 2 - 17 пациентов (8 мужчин, 9 женщин), фотосенсибилизатор - раствор Фурацилина.

Группа 3 - 13 пациентов (7 мужчин, 6 женщин), фотосенсибилизатор - раствор Фурасола.

Группа 4 - 15 пациентов (10 мужчин, 5 женщин), фотосенсибилизаторы - гиперициновые и хлорофилловые компоненты настоек зверобоя и эвкалипта.

Оценка биохимических показателей крови (ОАК)

У пациентов группы 1 уровень антистрептолизина-О в 57,7% случаев (n=25), до лечения составлял (220-300 ЕД/мл). После проведенного лечения АФДТ у всех пациентов показатель АСЛ-О пришёл к нормальным значениям и составил 120 – 200 Ед/л (p<0,05). У пациентов 2, 3 и 4-й групп при оценке показателей ОАК выявлено достоверное повышение показателя МСН с $M=6\pm 0,1$ до $M=18\pm 0,1$ (p=0,018) после курса АФДТ. После лечения в 83,3% (n=33) отмечалось снижение АЛАТ и АСАТ в обеих группах, также снизился коэффициент де Ритиса (АСАТ/АЛАТ) с $M=1,37\pm 0,1$ до $M=1,03\pm 0,1$, что может свидетельствовать о снижении эндогенной интоксикации. Через месяц после лечения у всех пациентов наблюдалось снижение показателя АСЛ-О (p<0,05) у 45,6% (n=18).