

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

**ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ АСПЕКТ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ
УГРЕВОЙ СЫПИ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 421 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

биологического факультета

Морозова Олега Алексеевича

Научный руководитель:

Доцент кафедры биохимии и

биофизики, к.б.н.

_____ Е. С. Тучина

Научный руководитель:

Ассистент кафедры биохимии

и биофизики, к.б.н.,

_____ М. В. Каневский

Зав. кафедрой биохимии и

биофизики, д.б.н., профессор

_____ С. А. Коннова

Саратов 2016

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Современные клинические методы лечения угревой болезни имеют низкую рекомендательную силу в связи с неизбирательным действием препаратов на микрофлору кожи человека. Фотодинамическая терапия угревой болезни актуальна в настоящее время в связи с тем, что обладает селективным спектром действия при ингибировании микроорганизмов вызывающих угревую болезнь, в частности главного участника *Propionibacterium acne*. До сих пор не разработан протокол лечения угревой болезни с помощью фотодинамической терапии (ФДТ). Это связано с недостатком данных клинических исследований такого вида терапии *in vivo* и *in vitro*.

Микробная этиология угревой болезни (акне) подтверждается целым рядом научных исследований. Сложный этиопатогенез связан с поражением сально-волосяного фолликула. При этом взаимосвязанными факторами возникновения акне могут быть: андроген-индуцированная секреция сальных желез, фолликулярный гиперкератоз, вследствие чего происходит патологическая бактериальная пролиферация *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* и др. микроорганизмов с последующим иммунным ответом организма и развитием воспалительных реакций.

P. acnes и *S. epidermidis* являются резидентами нормальной микрофлоры кожи человека. В частности, биопленкой, включающей данные микроорганизмы, покрыты части сально-волосяных фолликулов и другие участки кожных покровов. Выработка микроорганизмами - резидентами микрофлоры кожи специфических ферментов является одним из факторов защиты кожных покровов от заселения патогенной микрофлорой, этот процесс, известен как «колониционная резистентность». Поддержание роста естественной микрофлоры так же эффективно препятствует заселению и колонизации кожи транзитными микроорганизмами.

Цель работы заключалась в оценке *in vitro* чувствительности микроорганизмов-резидентов облигатной микрофлоры кожи человека к

фотодинамическому воздействию различными типами светового излучения и фотосенсибилизаторами и возможности регуляции их численности данным методом.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияния синего (405 нм) и красного (625 нм) светодиодного излучения с различными параметрами на выживаемость микроорганизмов-резидентов облигатной микрофлоры кожи человека.

2. Проанализировать чувствительность клеток микроорганизмов-резидентов облигатной микрофлоры кожи человека к комплексному действию синего (405 нм) и красного (625 нм) светодиодного излучения и фотосенсибилизатора метиленового синего.

3. Оценить эффективность комплексного фотодинамического воздействия с использованием красителя индоцианинового зеленого и инфракрасного (805 нм) лазерного излучения синего на микроорганизмы-резиденты облигатной микрофлоры кожи человека.

Структура бакалаврской работы. Выпускная квалификационная работа состоит из пяти частей: введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Основная часть включает в себя три раздела: обзор литературы, материал и методы, результаты исследования и обсуждение. Раздел обзор литературы состоит из пяти подразделов: биология угревой сыпи, методы лечения угревой сыпи, фотодинамическая терапия угревой сыпи, использование излучения синего спектра в терапии угревой сыпи, комбинированное излучение и фотосенсибилизаторы в терапии угревой сыпи, инфракрасное излучение и наночастицы в терапии угревой сыпи. Раздел материалы и методы состоит из четырех подразделов: объекты исследования, фотосенсибилизаторы, источники излучения, постановка эксперимента. Раздел результаты исследования и обсуждение включает в себя пять подразделов: действие синего светодиодного излучения (405 нм) на микроорганизмы, результаты исследования действия красного светодиодного излучения (625 нм), результаты исследования комбинированного действия синего

светодиодного излучения (405 нм) и красного светодиодного излучения (625 нм), результаты исследования действия лазерного инфракрасного излучения (805 нм), обсуждение результатов исследования.

Объекты исследования. В работе использовали следующие виды микроорганизмов: *P. acnes* 1450, метициллин-чувствительные (MS) штаммы *S. epidermidis* и *S. aureus*, метициллин-резистентные (MR) штаммы *S. epidermidis* и *S. aureus*. Культуры микроорганизмов были предоставлены СГМУ им. В.И. Разумовского (Саратов, Россия), ГИСК им. Л.А. Тарасевича (Москва, Россия), ИБФМ РАН (Пушино, Россия). *P. acnes* выращивали на тиогликолевой среде (Оболенск, Россия) с 0,01% содержанием сывороточного альбумина человека (HSA, Sigma-Aldrich Co., USA), инкубировали при 37°C в анаэроостате (АЕ-01, IAI RAS) содержащем смесь N₂ и CO₂ (9:1). Для культивирования стафилококков использовали ГРМ-агар (Оболенск, Россия) и температуру инкубации 37°C.

Фотосенсибилизаторы. В качестве фотосенсибилизаторов выступали метиленовый синий (МС) в концентрации 0,025% на основе дистиллированной воды или смеси глицерина, этанола и воды в соотношении 25:25:50, и индоцианиновый зеленый (ИЗ) в концентрации 0,1% на основе дистиллированной воды или смеси глицерина этанола и воды в соотношении 25:45:30.

Источники излучения. В качестве источника синего света, была использована светодиодная матрица с максимумом излучения 405 нм мощностью 5-80 мВт/см² с дозами 35, 70 и 144 Дж/см². Облучение длилось 30, 60, 120, 180 мин.

В качестве источника красного света, была использована светодиодная матрица с максимумом излучения 625 нм дозами от 10 до 59.4 Дж/см². Облучение длилось 5, 10, 15, 30 мин.

В качестве источника инфракрасного излучения был выбран диодный лазер с максимум 805 нм мощностью 50 мВт/см². Облучение длилось 5, 10, 15, 30 мин.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Экспериментальные исследования проводились на базе кафедры биохимии и биофизики, в лаборатории бактериологии НИЧ Саратовского национального исследовательского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского, в период с 2013 по 2015 год.

Постановка эксперимента. В бактериальную суспензию (концентрация 10^4 КОЕ/мл) добавляли растворы фотосенсибилизаторов с вышеупомянутой концентрацией, в соотношении 1:1, полученную смесь оставляли в темноте, в течение 10 мин. Затем суспензию помещали в иммунологический полистирольный планшет, в объеме 0,2 мл. После облучения с выбранными параметрами взвесь переносили на питательную среду в чашки Петри. Инкубировали в течение 24-72 ч при 37°C . После чего производился подсчет КОЕ. В качестве контроля были высеяны взвеси бактерий которые не подвергались воздействию облучения и фотосенсибилизатора.

Исследования с *P. acnes* проводили в анаэробных условиях. Секции иммунологического планшета были покрыты покровным стеклом, что бы предотвратить доступ воздуха во время экспозиции. Эксперименты с *S. epidermidis* MS, *S. epidermidis* MR, *S. aureus* MS, *S. aureus* MR проводились на открытом воздухе.

Каждый опыт был проведен в 10-ти кратной повторности. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали t-критерий Стьюдента, достоверными считали различия при вероятности ошибки $p < 0,05$.

Обсуждение результатов исследования. Угревая сыпь является мультифакторным заболеванием. Одной из причин является повышение численности бактерии *P. acnes*, превращающих триглицериды кожного сала в свободные жирные кислоты, безопасные для большинства микроорганизмов, что способствует размножению транзиторной микрофлоры. Бактериальные антигены, влияя на иммунную систему организма, способствуют развитию воспалительных элементов при угревой болезни.

Использование синего излучения (405 нм) является оптимальным для воздействия на эндогенные порфирины, спектр поглощения которых находится в пределах длин волн 400-420 нм, а так же 500-700 нм. Воздействие световым излучением с длиной волны, которая соответствует спектру поглощения экзогенного либо эндогенного фотосенсибилизатора приводит к фотодинамической реакции, стимулирующей образование активных форм кислорода, вызывающих гибель клетки. Использование синего света при фотодинамической терапии *in vivo* у ряда авторов показывало значительное улучшение. При интерпретации результатов должен быть учтен фактор воздействия воздушной среды, в которой проводились исследования. В нашем исследовании с использованием синего излучения для достоверного снижения коэффициента КОЕ *P. acnes* оказалась доза 144 Дж/см², в течение 120 мин, при дальнейшем воздействии происходило снижение всех штаммов микроорганизмов.

Использование красного (625 нм) излучения показало хорошее ингибирующее действие на штамм *P. acnes* и оказало стимулирующий эффект *S. epidermidis* в течение 30 мин воздействия. При этом происходили незначительные уменьшения показателей КОЕ штамма *S. aureus*. Спиртовые и водные растворы в сочетании с этим излучением через 15 мин показывали значительное снижение всех штаммов микроорганизмов кроме *P. acnes*, которые были на уровне 51%, это можно объяснить тем, что метиленовый синий, в связи со строением клеточной стенки, накапливается в микроорганизмах с разной скоростью. Незначительно повышение КОЕ *S. epidermidis* можно объяснить преобладанием биостимуляции красным светом над действием фотосенсибилизаторов.

Комбинированное действие синего светодиодного излучения (405 нм) и красного светодиодного излучения (625 нм) приводило к уменьшению всех штаммов микроорганизмов до 74-61% после 30мин, но при этом происходила биостимуляция метициллин-устойчивого штамма *S. aureus*. Полученные результаты можно объяснить тем, что стафилококки и эволюционно

приспособлены к влиянию такого фактора как солнечная радиация. Вероятно, активные формы кислорода, образующиеся под влиянием квантов света, эффективно поглощаются защитными системами клетки.

При воздействии красным излучением на *P. acnes* в течение 5-10 мин стимулировало развитие данного штамма, а увеличение временных интервалов до 15-30 мин приводило к снижению показателя КОЕ. Так же установлено, что использование водного раствора индоцианина зеленого усиливало ингибирующее действие лазерного инфракрасного излучения. Так же выяснили, что метициллин-чувствительный штамм *S. epidermidis* не подвержен действию лазерного инфракрасного излучения (805 нм) с использованием индоцианина зеленого в водном растворе, при используемой нами концентрации. Сокращение численности штаммов *S. epidermidis* происходило лишь после облучения клеток, сенсibilизированных глицерин-спиртовым раствором индоцианина зеленого. Применение водного раствора индоцианина зеленого обуславливало стимуляцию размножения метициллин-устойчивого штамма *S. epidermidis* после 5 и 30 мин действия лазерного инфракрасного излучения (805 нм), за счет преобладания защитных свойств бактериальных клеток над фотодинамическим воздействием. Установлено, что действие лазерного инфракрасного излучения (805 нм) на обработанные водно-глицерин-спиртовым раствором индоцианинового зеленого клетки метициллин-устойчивого штамма *S. epidermidis* подавляло их размножение.

Для разработки протоколов лечения угревой болезни требуется больше данных о механизмах действия компонентов фотодинамической терапии. Большинство исследователей проводят эксперименты *in vivo*, что не позволяет изучить отдельно взятые компоненты, в частности подобрать оптимальные варианты воздействия фотодинамической терапии на микрофлору кожи человека.

Экологический аспект фотодинамической терапии угревой болезни заключается в регуляции численности микроорганизмов-резидентов микрофлоры кожи человека. Изменение параметров, таких как типы и дозы

излучения, использование различных фотосенсибилизаторов и их комбинаций, дает возможность, определить оптимальные параметры для снижения или повышения численности *P. acnes*, *S. epidermidis*, *S. aureus*.

Способность синего излучения подавлять численность микроорганизмов дает возможность его использования при фотодинамической терапии угревой болезни в качестве ингибирующего фактора для таких микроорганизмов как *P. acnes*, *S. epidermidis*, *S. aureus*. При этом, основываясь на экспериментальных данных, имеется возможность осуществлять подбор оптимальных параметров необходимых для снижения численности этих микроорганизмов до необходимого уровня. В результате действия излучения будет происходить подавление жизнеспособности микроорганизмов, но не будет достигаться их полное уничтожение для сохранения экологического баланса и видового разнообразия.

Действие красного излучения в нашем исследовании проявило себя в качестве агента стимулирующего рост *S. epidermidis*. Как известно, эти микроорганизмы состоят в симбиозе с организмом человека, а также участвуют в качестве защитных агентов кожных покровов и способны обеспечивать защитные функции кожи. Защищая свою область обитания путем выработки специфических продуктов метаболизма и обеспечивая колонизационную резистентность, данные бактерии тем самым играют важную роль в защите кожных покровов макроорганизма.

Очевидно, что снизить до определенного уровня количество микроорганизмов *P. acnes* возможно посредством синего излучения. Но, как правило, для этого необходимо большее количество энергии излучения, чем для *S. epidermidis*. Гибель стафилококков может быть скомпенсирована использованием красного излучения в дозах, продемонстрировавших стимулирующий эффект в наших экспериментах.

Также в наших исследованиях установлена способность инфракрасного излучения совместно с фотосенсибилизатором индоциановым зеленым в водном растворе эффективно снижать численность *P. acnes* и *S. aureus*, тем

самым уменьшить число воспалительных элементов на коже, при этом, значительно не влияя на уровень численности *S. epidermidis*. В случае, если необходимо повысить численность *S. epidermidis* и *S. aureus* до нормального уровня, для стимуляции можно воспользоваться комбинированным или инфракрасным излучением.

Способность одного и того же светового излучения, и одного и того же фотосенсибилизатора в одно и тоже время стимулировать рост одних и ингибировать рост других микроорганизмов, а так же применение светового излучения и фотосенсибилизаторов с прямо противоположным действием, корректируя их использование в фотодинамической терапии угревой болезни, обеспечивает тонкую настройку метода, учитывающую не только особенности экологии микроорганизмов, но и патологическую ситуацию для конкретного пациента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фотодинамическая терапия в качестве средства лечения угревой болезни доказала свою высокую эффективность. В настоящее время на основании проведенных исследований составляются протоколы лечения, происходит выбор источников света, типов фотосенсибилизатора, дозы, время инкубации, количества обработок и интервалов. В качестве фотосенсибилизирующих агентов при лечении акне используют аминолевулиновую кислоту, метиленовый синий, индолилуксусную кислоту, индоцианиновый зеленый.

Фотодинамическая терапия является важной альтернативой для пациентов, которые терпят неудачу при традиционной терапии, или в тех случаях, когда невозможно прибегнуть к системным или топическим методикам антибиотикотерапии, например, при терапии угревой болезни у беременных. Уже более 10 лет накапливается значительный объем данных, об эффективности и безопасности данного вида терапии. Последние призывы ограничить антибиотики из-за опасений по поводу резистентности бактерий делают этот вид терапии более привлекательным. Так же, несмотря на экономические и практические барьеры использования этого метода и требование избегать солнечного света в течение двух суток, использование этой терапии продолжает расти во всем мире, и есть надежда, что в скором времени произойдет включение протоколов лечения официальной медициной в практическое применение, и эти барьеры будут преодолены.

Однако, большинство исследователей проводят эксперименты *in vivo*, что не позволяет изучить отдельно взятые компоненты, в частности, подобрать оптимальные варианты воздействия непосредственно на микроорганизмы – возбудители акне человека. Существенным преимуществом является то, что в результате фотодинамического воздействия можно добиться значительного снижения численности *P. acnes*, стимулировать рост облигатной микрофлоры восстановить нормальный видовой баланс микробиома кожи человека, естественную защиту от заселения транзиторными микроорганизмами.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что синее (405 нм) излучение снизило коэффициент КОЕ *P. acnes* через 240 мин воздействия при дозе 35 Дж/см² до 47%, при дозе 70 Дж/см² до 38%, при дозе 144 Дж/см² до 5%. При этом показатели КОЕ для других штаммов через 240 мин воздействия не превысили 41%, по отношению к контрольным группам микроорганизмов.
2. Обнаружено, что красное (625 нм) излучение снизило коэффициент КОЕ *P. acnes* через 30 минут воздействия до 30%. Данный показатель возрос до 130% у штамма *S. epidermidis* через 5 мин облучения. При этом красное излучение в сочетании с метиленовым синим снизило показатели КОЕ всех штаммов ниже 15% по отношению к контрольным группам микроорганизмов.
3. Выявлено, что комбинированное излучение (405 нм + 625 нм) через 30 мин воздействия вызвало снижение коэффициента КОЕ *P. acnes* до 61%, *S. epidermidis* до 74%. Для *S. aureus* через 5 мин облучения была характерна тенденция роста данного показателя до 130%. Комбинированное излучение в сочетании с метиленовым синим снизило данный показатель всех штаммов до 3% по сравнению с контрольными группами микроорганизмов.
4. Установлено, что инфракрасное излучение (805 нм) через 30 мин воздействия снизило коэффициенты КОЕ *P. acnes* до 43%, *S. epidermidis* до 50%, *S. aureus* до 79%. Инфракрасное излучение в сочетании с индоцианиновым зеленым в водном растворе снизило данный показатель *S. aureus* до 25%. Инфракрасное излучение в сочетании с индоцианиновым зеленым в водно-глицерин-спиртовом растворе снизило данные показатели КОЕ всех штаммов ниже 35% по отношению к контрольной группе микроорганизмов.