

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ ГНОЙНЫХ АБСЦЕССОВ
МЯГКИХ ТКАНЕЙ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 424 группы

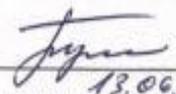
Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Ефимовой Екатерины Сергеевны

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук


13.06.24.
дата, подпись

Е.С. Тучина

Зав. кафедрой:

профессор, док. биол. наук


13.06.24.
дата, подпись

С.А. Коннова

Саратов, 2024

Введение

Актуальность темы. Фотодинамическая терапия (ФДТ) — современный и неинвазивный вид терапии, используемый при лечении онкологических заболеваний, а также неонкологических заболеваний различного типа и локализации [28].

В последние годы увеличивается количество резистентных к антибиотикам штаммов бактерий, включая *Staphylococcus aureus*, что создает серьезную проблему для терапии инфекций. Инфекции, вызываемые бактериями *S. aureus* являются причинами заболеваний, трудно поддающиеся обычному лечению, в их числе различные гнойные абсцессы [1]. Фотодинамическая терапия (ФДТ) является наиболее щадящим методом лечения гнойных инфекций, который позволяет в кратчайшие сроки достигнуть заживляющего эффекта, при этом не подвергая макроорганизм стрессу. Интерес к АФДТ как к методу лечения инфекционных заболеваний значительно возрос за последнее десятилетие [1]. Его применимость установлена в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, грибов и простейших. В апреле 2014 года Всемирная организация здравоохранения опубликовала доклад, в котором предупредила, о приближении «пост-антибиотической» эры, «когда легкие травмы и обычные инфекции могут привести к смерти».

Грамположительные и грамотрицательные супербактерии, такие как *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и виды *Enterobacter*, так называемые возбудители «ESKAPE», способны противостоять практически всем типам/классам антибиотиков. Поэтому поиск новых подходов к борьбе с бактериями с множественной лекарственной устойчивостью становится все более важным [2].

Исследования в области развития метода АФДТ, открывает широкие спектры возможностей областях медицины, в том числе хирургии, что помогает улучшить качество жизни пациентов и обеспечить более

эффективное лечение различных заболеваний.

Цель и задачи исследования.

Целью работы являлось сравнение эффективности двух комбинаций «излучение + фотосенсибилизатор» для фотодинамической терапии гнойных абсцессов мягких тканей у лабораторных животных.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить чувствительность исследуемого штамма *S. aureus* к двум выбранным комбинациям «излучение + фотосенсибилизатор» при фотодинамическом воздействии *in vitro*
2. Оценить возможность использования 0,24% раствора интралипида в качестве растворителя для фотосенсибилизаторов.
3. Выявить изменения в показателях крови, бактериальной обсемененности, объемах гнойных абсцессов у лабораторных животных при использовании двух выбранных комбинаций «излучение + фотосенсибилизатор» при фотодинамической терапии *in vivo*
4. Разработать на основании полученных данных коэффициенты для оценки эффективности фотодинамической терапии.

Материалы и методы исследования.

В качестве тест-культуры для проведения исследований использовали штамм *S. aureus* 2a, предоставленный музеем кафедры микробиологии и вирусологии СГМУ им. В.И. Разумовского. При постановке опытов использовали суточную бактериальную культуру, выращенную при температуре 37°C на универсальной питательной среде (ГРМ-агар или ГРМ-бульон, г. Оболенск, Россия).

Источником фиолетового излучения служил светодиодный прибор с максимумом спектра испускания $\lambda=405\pm 30$ нм, плотностью мощности 80 мВт/см².

Источником светодиодного красного излучения служил светодиодный прибор с максимумом спектра испускания $\lambda=660\pm 10$ нм, плотностью мощности 30 мВт/см².

В качестве фоточувствительного агента в сочетании с фиолетовым излучением использовали пиридилпорфирин в концентрации 0,1 %, растворенный в 0,9% физиологическом растворе или в 0,24% растворе интралипида (Fresenius Kabi, Германия).

В качестве фоточувствительного агента в сочетании с красным излучением использовали метиленовый синий в концентрации 0,0001 %, растворенный в 0,9% физиологическом растворе или в 0,24% растворе интралипида (Fresenius Kabi, Германия).

Для создания асептических условий в ходе эксперимента использовали стерильный полистирольный 96-луночный планшет; источник излучения располагали над ячейками планшета. При постановке опытов брали культуру *S. aureus* 2a, предварительно выращенную в течение 24 ч при температуре 37 °С на плотной питательной среде. Бактериальную взвесь готовили в стерильном физиологическом растворе методом последовательных десятикратных разведений; конечная концентрация составляла 10^3 микробных клеток (м.к.) в 1 мл. Контрольные образцы взвеси инкубировали в течение 15 мин без доступа света. Бактериальную взвесь из конечного разведения 10^3 м.к./мл вносили в ячейки планшета в объеме 0,1 мл. По истечении времени воздействия источник излучения отключали, взвеси бактерий из данных ячеек переносили на чашки Петри с плотной питательной средой и равномерно распределяли по поверхности стерильным шпателем. Учет результатов проводили путем подсчета числа колониеобразующих единиц (КОЕ) через 24 часа после инкубации при 37°С.

Моделирование гнойного абсцесса проводили в соответствии с методикой, разработанной ранее [3]. Транскутанно вводили модифицированный катетер Фоллея, укороченный до 3 см, с баллоном из силиконовой резины на дистальном конце. После заполнения баллона 2 мл физиологического раствора (NaCl 0,9%), производили перевязку катетера проксимальнее баллона и фиксацию дистальной части его при помощи кожной дубликатуры. Для гарантированного формирования острого ГА наносили

культуру возбудителя патологического процесса *S. aureus* 2a непосредственно на поверхность дистального отдела катетера. На 5-е сутки опорожняли баллон, удаляли катетер. Кровь для общего и биохимического анализа бeralи из хвостовой вены. Проводили 2 независимые серии экспериментов. В первой серии опытов использовали светодиодное фиолетовое излучение и пиридилпорфириин, во второй серии опытов – светодиодное красное излучение и метиленовый синий. Как в первой серии, так и во второй животных делили на 4 группы (по 4 крысы в каждой), из которых первая группа была контрольной, остальные опытными.

Для сравнения эффективности двух комбинаций для ФДВ использовали оригинальный способ [4]. Для этого определяли общее число лейкоцитов, общее число тромбоцитов, концентрацию креатинина и концентрацию гемоглобина, определяют среднее значение нормы общего числа лейкоцитов, общего числа тромбоцитов, содержания креатинина и гемоглобина. Коэффициенты K_1 и K_2 определяют из соотношений:

$$K_1 = \frac{L_{ex}/L_n}{T_{ex}/T_n} \quad (1)$$

$$K_2 = \frac{C_{ex}/C_n}{H_{ex}/H_n} \quad (2)$$

где:

L_{ex} – значение общего числа лейкоцитов, полученное в эксперименте,

L_n – среднее значение нормы общего числа лейкоцитов,

T_{ex} - значение общего числа тромбоцитов, полученное в эксперименте,

T_n – среднее значение нормы общего числа тромбоцитов,

C_{ex} – значение содержания креатинина в крови, полученное в эксперименте,

C_n – среднее значение нормы содержания креатинина,

H_{ex} – значение содержания гемоглобина в крови, полученное в эксперименте,

H_n – среднее значение нормы содержания гемоглобина.

На основании этих данных рассчитывали по коэффициентам K_1 и K_2 , при значении коэффициентов K_1 и K_2 более единицы делают вывод об отсутствии эффективности ФДВ, при значении коэффициентов K_1 и K_2 более или равном единице делают вывод о наличии эффективности ФДВ.

Дополнительно рассчитывали общее изменение объема полости гнойного абсцесса и определяют значение скорости редукции из соотношений:

$$V_a = \frac{a_o * b_o * h_o}{a_k * b_k * h_k} \quad (3)$$

$$v_r = V_a / \text{сут} \quad (4)$$

где:

V_a - объем полости гнойного абсцесса (см^3),

a_o, b_o, h_o - три взаимно перпендикулярных диаметра полости абсцесса у экспериментальных животных (см),

a_k, b_k, h_k - три взаимно перпендикулярных диаметра полости абсцесса у контрольных животных в см,

v_r – скорость редукции полости гнойного абсцесса в $\text{см}^3/\text{сут}$.

сут. – число дней наблюдения.

Структура и объем работы. Работа, изложенная на 47 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников, приложения. Исследование проиллюстрировано 4 рисунками и содержит 9 таблиц. Список использованных источников включает в себя 54 наименования.

Основное содержание работы

В главе «Обзор литературы» представлен анализ литературных данных о методе фотодинамической терапии, механизмы ее работы и особенности, а также была изучена информация о различных фотосенсебилизаторах, которые могут быть использованы в данном методе. Изложена информация о патогенных микроорганизмах, вызывающих гнойные инфекции, в том числе,

Staphylococcus aureus. В этом разделе также рассказано об особенностях формирования гнойных абсцессов, которые быть серьезной проблемой внутрибольничных инфекций.

В главе «Результаты исследования» были собраны и описаны данные по проведенному анализу. При анализе результатов эксперимента *in vitro*, был сделан вывод о том, что использование интралипида является перспективным для АФДТ. Выявлено стойкое подавление жизнеспособности клеток *S. aureus* 2а (с использованием пиридилпорфирина в качестве фотосенсибилизатора на 90%, с использованием метиленового синего на 71%) после 15 мин действия излучения. Для дальнейшего проведения эксперимента *in vivo* была взяты смеси фотосенсибилизаторов в интралипиде.

При использовании светодиодного фиолетового (405 нм) излучения и пиридилпорфирина в качестве фотосенсибилизатора отмечено изменение коэффициентов K_1 и K_2 . Показатель K_1 находится в пределах 1 у здоровых и выздоравливающих животных. При сформированном гнойном абсцессе значения K_1 возрастали в 2-3 раза. Изменения достоверны по сравнению с физиологической нормой. В ходе лечения происходило изменение концентрации основных биохимических показателей крови. Отмечено увеличение СОЭ в 2 раза, что свидетельствовало об активном протекании воспалительного процесса у больных животных. Показатель K_2 у здоровых и выздоравливающих животных не превышал 1, при сформированном гнойном абсцессе его значение возрастало в 1,5 раза. Скорость сокращения объема v_r полости гнойного абсцесса для контрольных групп животных составляла 0,06-0,09 см³/сут, для групп 3 – не более 0,04 см³/сут, для групп 4, получавших лечение с помощью фиолетового излучения (405 нм) и пиридилпорфирина – 0,1-0,12 см³/сут.

При использовании светодиодного красного (660 нм) и метиленового синего также происходили изменения в значениях коэффициентов K_1 и K_2 . Показатель K_1 находится в пределах 1 у здоровых и выздоравливающих животных. При сформированном гнойном абсцессе значения K_1 возрастали в

3 раза. В ходе лечения происходило изменение концентрации основных биохимических показателей крови. Отмечено значительное увеличение СОЭ, как основного маркера воспаления.

Динамика изменения значений коэффициентов схожа для двух используемых схем фотодинамического воздействия. В обоих случаях к 10 дню обработки происходило снижение K_1 до 0,70-0,74 и K_2 до 0,66-0,71 для 4 экспериментальной группы. Снижение коэффициентов у в контрольных группах до нормальных значений связано с использованием антибиотических препаратов. Однако, судя по значениям коэффициентов метод антимикробной фотодинамической терапии показывает лучший терапевтический эффект, регистрируемый как по убыли численности микроорганизмов в области абсцесса, так и по УЗИ-исследованиям, и по данным гистологического анализа.

Выводы

1. Установлено, что комбинация «фиолетовое излучение + пиридилпорфирин» оказывает *in vitro* более выраженное действие на исследуемый штамм *S.aureus*, после 15 мин обработки происходило сокращение числа КОЕ на 89%, а после 30 мин – на 92%.

2. Проведенные исследования показали, что применение фотодинамического воздействия *in vitro* в сочетании с фотосенсибилизирующим агентом, растворенным в 0,24% интралипиде, вызывает снижение численности *S.aureus* на 85-92%.

3. При анализе полученных данных выявлено что комбинация фиолетового (405 нм) излучения и 0,1% пиридилпорфирина в 0,24% растворе интралипида приводит к снижению значений коэффициентов K_1 и K_2 до нормы к 10 дню терапии, на 70-80% ускоряет заживление полости гнойного абсцесса и на 10^7 КОЕ/мл снижает микробную обсемененность экссудата на 10 день проводимой терапии.

4. Полученные результаты показали, что комбинация красного

(660 нм) излучения и 0,0001% метиленового синего в 0,24% растворе интралипида приводит к нормализации коэффициентов K_1 и K_2 , на 50-60% ускоряет облитерацию полости гнойного абсцесса и на 10^6 КОЕ/мл снижает микробную обсемененность экссудата на 10 день проводимой терапии.

Список использованных источников

- 1 Gillespie, S. H. Principles and practice of clinical bacteriology / S. H. Gillespie, P. M. Hawkey // N. J.: John Wiley & Sons, 2006. – 616 p.
- 2 Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections / Y. Liu [et al.] // Journal of clinical and translational research. – 2015. – Vol. 1, N 3. – P. 140-167.
- 3 Патент РФ №2601378 «Способ моделирования абсцессов мягких тканей» / Алипов В.В., Урусова А.И., Андреев Д.А. [и др.], опубл. 10.11.2016.
- 4 Патент РФ № 2023115100/14(032194) «Способ оценки эффективности фотодинамической терапии гнойных абсцессов» / Тучина Е.С., Каневский М.В, Алипов В.В. [и др.], опубл. 08.06.2023.

