

## ВОЗМОЖНОСТИ МЕТИЛЕНОВОЙ СИНИ В ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ИНАКТИВАЦИИ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ

Садыков Р.А., \*Баженов Л.Г., \*\*Касымова К.Р., \*\*\*Садыков Р.Р.

Ташкентская медицинская академия, кафедра факультетской и госпитальной хирургии,  
Узбекистан, г. Ташкент, тел.: +99897 154 56 02, e-mail: abdurasul@inbox.ru;  
\*Республиканский специализированный научный центр хирургии им. акад. В.Вахидова,  
Узбекистан, г. Ташкент, e-mail: leobaj@tps.uz;  
\*\*Республиканский научный центр экстренной медицинской помощи,  
Узбекистан, г. Ташкент, пр. Дружбы народов, 62, e-mail: kamola\_gustamovna@yahoo.com;  
\*\*\*Ташкентская медицинская академия, кафедра ВОП хирургии,  
Узбекистан, г. Ташкент, e-mail: srrdoktor@yahoo.com

*Изучены антибиотикограммы 63 штаммов госпитальных штаммов *Klebsiella pneumoniae* и возможность их инактивации с помощью фотодинамического воздействия. В качестве фотосенсибилизатора использовали растворы метиленового синего в концентрациях 0,001%, 0,005%, 0,01% и 0,05%; источником красного светового излучения служила установка ФДУ-1 (спектральный диапазон 600-660 нм, мощность 5 Вт, плотность мощности – 250-500 мВт/см<sup>2</sup>). Установлено, что антимикробная активность фотодинамической терапии зависит как от концентрации метиленового синего, так и от экспозиции облучения. Наиболее выраженный эффект был при использовании 0,05% раствора метиленового синего и экспозиции 3-10 мин. Таким образом, антимикробная фотодинамическая терапия характеризуется выраженной ингибирующей активностью в отношении полирезистентных штаммов *K. pneumoniae*, что свидетельствует о перспективности ее применения для лечения внутрибольничных гнойно-воспалительных процессов.*

**Ключевые слова:** фотодинамическая терапия, *Klebsiella pneumoniae*, полирезистентные штаммы

### Введение

Рост устойчивости к антибиотикам возбудителей нозокомиальных инфекций — одна из наиболее серьезных проблем современной медицины. От 25% до 30% всех госпитализированных больных получают антибиотики, и при этом по крайней мере половине из них неверно подбирается схема лечения или препарат [3, 4, 5].

В настоящее время очевидна опасность пассивного отношения к возникновению и распространению антибиотикорезистентности и важность борьбы с этим процессом. При этом речь идет не столько о быстрейшем внедрении в практику новых антимикробных препаратов, сколько о раннем выявлении неблагоприятных тенденций и разработке мер, направленных на снижение устойчивости к антибиотикам, а также на поиск альтернативных подходов к инактивации болезнетворных микроорганизмов [3, 5].

Фотодинамическая терапия (ФДТ) в последнее время привлекает пристальное внимание исследователей вследствие ее высокой эффективности. Ан-

тимикробная ФДТ характеризуется широким спектром действия и, в отличие от антибиотиков, практически полным отсутствием побочных эффектов и неспособностью микроорганизмов вырабатывать устойчивость к данному фактору. Ее суть заключается в избирательной окислительной деструкции патогенных микроорганизмов при одновременном воздействии фотосенсибилизатора (красителя) и оптического излучения с соответствующей длиной волны. Находясь в возбужденном состоянии, молекулы фотосенсибилизатора генерируют активные формы кислорода (синглетный кислород), индуцирующие повреждение различных клеточных структур и гибель микробных клеток [1, 2, 6, 7].

**Целью** настоящего исследования явилось изучение антибиотикограммы госпитальных штаммов *Klebsiella pneumoniae* и возможности их инактивации с помощью фотодинамического воздействия.

### Материал и методы исследования

В качестве фотосенсибилизатора использовался раствор метиленовой сини. Спектр погло-

щения 0,01% метиленовой сини исследовали на спектрофотометре Аста-С-III фирмы Beckman (США). На рис. 1 представлен график зависимости оптической плотности поглощающего раствора от длины волны излучения. Установлено, что спектр поглощения метиленовой сини имеет максимум в области длин волн от 500 до 700 нм.

Для проведения ФДТ использовалась светодиодная установка ФДУ-1 с площадью излучателя 5 см<sup>2</sup>, имеющая специальную насадку, позволяю-

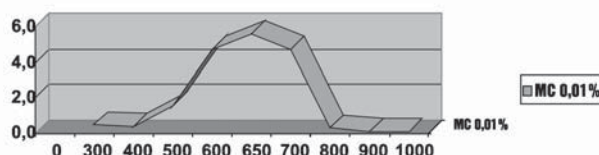


Рис. 1. Спектр поглощения метиленовой сини

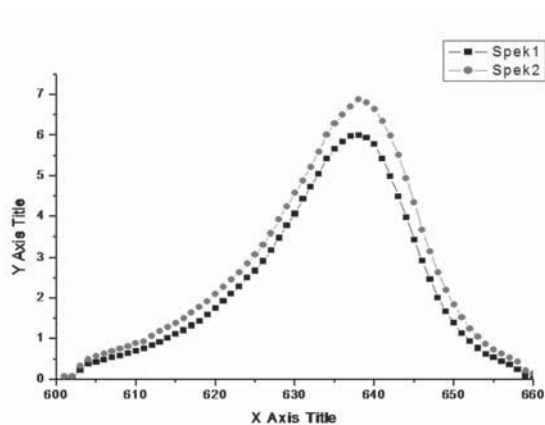


Рис. 2. Спектр излучения установки ФДУ-1

щую сфокусировать излучение на площади 2 см<sup>2</sup>. Спектр излучения установки имеет максимум в области длин волн 600-660 нм (рис. 2). Мощность излучения 5 Вт, плотность мощности – 200 мВт/см<sup>2</sup>.

Изучено 63 штамма *K. pneumoniae*, изолированных из патологического материала (отделяемое ран, дренажей, трахеи; пунктаты и промывные воды бронхов) больных хирургического стационара с различными гнойно-воспалительными процессами. Видовую принадлежность выделенных штаммов определяли с помощью диагностических наборов «Микро-Ла-Тест» (Pliva-Lachema, Чехия). Для тестирования β-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) использовали метод «двойных дисков» [4]. Чувствительность к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом с помощью стандартных коммерческих дисков (HiMedia, Индия).

Изучение фотодинамической инактивации клебсиелл выполняли *in vitro* на плотной среде. При этом в качестве фотосенсибилизатора ис-

пользовали растворы метиленовой сини с концентрацией 0,001%, 0,005%, 0,01% и 0,05%. Исследование выполняли следующим образом: на чашку с питательным агаром засеивали газонемную суточную тест-культуру *K. pneumoniae*, затем на поверхность газона помещали каплю раствора метиленовой сини; после 10-минутной экспозиции зону контакта микроорганизмов и метиленовой сини облучали красным светом в течение 1, 5 или 10 мин. Расстояние от излучателя до поверхности питательной среды составляло 2,5 см. Затем посеивы помещали в термостат при 37°C на 18-24 часа. Учет результатов выполняли путем определения наличия или отсутствия микробного роста в зоне облучения тест-штамма.

### Результаты и обсуждение

Из 63 штаммов *K. pneumoniae* наибольшее количество культур (53,1%) выделено в период с января по апрель, пик высеваемости наблюдался в марте (37,5%). Чаще всего (56,3% случаев) этот микроорганизм обнаруживался у больных отделения реанимации и интенсивной терапии. При этом в 44,4% случаев он был изолирован из ран, в 27,8% – из отделяемого трахеи, в остальных случаях – из других видов материала.

Анализ антибиотикограмм показал, что выделенные штаммы *K. pneumoniae* обладали очень высокой резистентностью к антибиотикам. Так, например, их устойчивость к защищенным пенициллинам - амоксицилину/клавуланату (амоксилав) и ампицилину/сульбактаму (уназин) - составила 100%. Резистентность к цефалоспорином распределилась так: 21,1% штаммов было устойчиво к цефоперазону/сульбактаму (сульперазон), 62,1% - к цефуроксиму, 71,1% - к цефтазидиму, 86,8% - к цефтриаксону, 89,5% - к цефотаксиму, по 91,1% - к цефазолину и цефоперазону. Высокую резистентность штаммы *K. pneumoniae* демонстрировали также к фторхинолонам: к офлоксацину - 73,3% культур, к ципрофлоксацину - 70,0%. В отличие от гентамицина (81,6% резистентных штаммов), другой аминогликозид - амикацин - был неактивным только в отношении 30,0% штаммов.

Во многом полирезистентность госпитальных штаммов *K. pneumoniae* определяется продукцией ими БЛРС [3, 4]. Из 63 штаммов *K. pneumoniae* БЛРС продуцировали 57 (90,5%), а БЛРС-негативными оказались лишь 6 (9,5%) штаммов.

При изучении фотодинамической инактивации штаммов *K. pneumoniae* на первом этапе исследовались антимикробные свойства по отдельности только излучения и только растворов метиленовой сини.

При этом установлено полное отсутствие с их стороны антимикробной активности в отношении изученных штаммов *K. pneumoniae*, тогда как комбини-

Как видно из этой таблицы, антимикробная активность ФДТ прямо зависела как от концентрации метиленовой сини, так и от длительности облучения. Наиболее выраженный эффект наблюдался при использовании 0,05% раствора метиленовой сини. Если при продолжительности облучения 1 мин еще регистрировался слабый разреженный рост колоний, то при больших экспозициях (3-10 мин.), микробный рост в зоне облучения полностью отсутствовал.

Таблица 1  
Результаты фотодинамического воздействия на культуру *K. pneumoniae*

Длительность светового воздействия, мин.	Количество штаммов	Концентрация раствора МС, %			
		0,001	0,005	0,01	0,05
1	8	++++	++	+	+
3	8	++++	++	0	0
5	8	+++	+	0	0
10	8	++	0	0	0
Контроль (без облучения)	8	++++	++++	++++	++++

Условные обозначения: +, ++, +++, ++++ - интенсивность микробного роста; 0 – отсутствие микробного роста.

ванное воздействие обоих факторов было эффективным. Полученные результаты представлены в табл. 1.

### Выводы

Представленные данные свидетельствуют о существенной ограниченности возможностей антибиотикотерапии гнойно-воспалительных процессов, вызванных госпитальными штаммами *K. pneumoniae*, что и обусловило целесообразность изучения возможностей ФДТ в данной ситуации. Антимикробная ФДТ характеризуется выраженной ингибирующей активностью в отношении полирезистентных штаммов *K. pneumoniae*, что свидетельствует о перспективности ее применения для лечения внутрибольничных гнойно-воспалительных процессов.

### Литература

1. Гейниц А.В. Фотодинамическая терапия гнойных и длительно не заживающих ран / А.В.Гейниц, П.И.Толстых, В.А.Дербенев и соавт.- М., 2004.- 12 с.
2. Салмин Р.М. Основные направления фотодинамической терапии в медицине / Р.М.Салмин, А.А.Стенько, И.Г.Жук, М.Ю.Брагов // Новости хирургии.- 2008.- №3.- С.155-162.
3. Страчунский Л.С. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Л.С.Страчунский, Ю.Б.Белоусов, С.Н.Козлов.- Смоленск: МАКМАХ, 2007.- 464 с.
4. Эйдельштейн М.В. Выявление β-лактамаз расширенного спектра у грамотрицательных бактерий с помощью фенотипических методов // Клиническая микробиология.- 2001.- №2.- С.183-189.
5. Bergogne-Berezin E. Current guidelines for the treatment and prevention of nosocomial infections // Drugs.- 1999.- Vol.58, Suppl.1.- P.51-67.
6. Luksienė Z. Prospects of photosensitization in control of pathogenic and harmful micro-organisms / Z.Luksienė, A.Zukauskas // Journal of Applied Microbiology.- 2009.- №3.- P.1-6.
7. Tavares A. Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment / A.Tavares, C.Carvalho, M.Faustino et al. // Mar. Drugs.- 2010.- Vol.8.- P.91-105.

**МОЖЛИВОСТІ МЕТИЛЕНОВОЇ СИНІ  
В ФОТОДИНАМІЧНІЙ ІНАКТИВАЦІЇ АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНИХ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ**

Садиқов Р.А., \* Баженов Л.Г., \*\* Касимова К.Р., \*\*\* Садиқов Р.Р.  
Ташкентська медична академія, кафедра факультетської та госпітальної хірургії,  
Узбекистан, м. Ташкент, тел.: +99897 154 56 02, e-mail: abdurusul@inbox.ru;  
\* Республіканський спеціалізований науковий центр хірургії ім. акад. В. Вахідова,  
Узбекистан, м. Ташкент, e-mail: leobaj@tps.uz;  
\*\* Республіканський науковий центр екстреної медичної допомоги,  
Узбекистан, м. Ташкент, пр. Дружби народів, 62, e-mail: kamola\_rustamovna@yahoo.com;  
\*\*\* Ташкентська медична академія, кафедра ВОП хірургії,  
Узбекистан, м. Ташкент, e-mail: srrdoktor@yahoo.com

Вивчено антибіотикограми 63 штамів госпітальних штамів *Klebsiella pneumoniae* і можливість їх інактивації за допомогою фотодинамічної дії. В якості фотосенсибілізатора використовували розчини метиленового синього в концентраціях 0,001%, 0,005%, 0,01% і 0,05%; джерелом червоного світлового випромінювання служила установка ФДУ-1 (спектральний діапазон 600-660 нм, потужність 5 Вт, щільність потужності - 250 -500 мВт/см<sup>2</sup>). Встановлено, що антимікробна активність фотодинамічної терапії залежить як від концентрації метиленового синього, так і від експозиції опромінення. Найбільш виражений ефект був при використанні 0,05% розчину метиленового синього та експозиції 3-10 хв. Таким чином, антимікробна фотодинамічна терапія характеризується вираженою інгібіруючою активністю щодо полірезистентних штамів *K. pneumoniae*, що свідчить про перспективність її застосування для лікування внутрішньолікарняних гнійно-запальних процесів.

**Ключові слова:** фотодинамічна терапія, *Klebsiella pneumoniae*, полірезистентні штами

**ABILITY OF METHYLENE BLUE  
IN PHOTODYNAMIC INACTIVATION OF BACTERIA ANTIBIOTIC-RESISTANT STRAINS**

Sadykov R.A., \*Bazhenov L.G., \*\* Kasymova K.R., \*\*\*Sadykov R.R.  
Tashkent Medical Academy, Department of Faculty Hospital and Surgery  
Uzbekistan, Tashkent, tel.: +99897 154 56 02, e-mail: abdurusul@inbox.ru;  
\* Acad. V. Vakhidov Republican Specialized Research Center of Surgery,  
Uzbekistan, Tashkent, e-mail: leobaj@tps.uz;  
\*\* National Research Center of Emergency Medicine,  
Uzbekistan, Tashkent, etc. Friendship of Peoples, 62, e-mail: kamola\_rustamovna@yahoo.com;  
\*\*\* Tashkent Medical Academy, Department of GP surgery  
Uzbekistan, Tashkent, e-mail: srrdoktor@yahoo.com

Hospital strains of *Klebsiella pneumoniae* (n=63) were investigated on inactivation possibility with photodynamic therapy (PDT). As photosensitizer was used methylene blue (MB) in concentrations 0,001%, 0,005%, 0,01% and 0,05%. Red light with spectral characteristic 600-660 nm, power 5W, power density 250-500 mW/cm<sup>2</sup> was generated by FDU-1 apparatus. It was established that antimicrobial activity of PDT for bacteria depend on MB concentration and light exposition. Most dominate effect was occurred in 0,05% concentration MB and light exposition 3-5 minutes. Thereby antimicrobial activity of PDT characterized domination inhibition for polyresistant strains *K. pneumoniae*, wich show prespectivity for treatment of patient with pyo-inflammatory diseases.

**Keywords:** photodynamic therapy, *Klebsiella pneumoniae*, polyresistant strain