Експериментальні дослідження

УДК 617.713.443:616.992:615.831.4/6+615.831

Вивчення впливу in vitro на грибкову флору Candida albicans та Fusarium spp ультрафіолетового випромінювання довжиною хвилі 365 нм та низькоенергетичного лазерного випромінювання 630-670 нм з використанням фотосенсибілізаторів

Л. Ф. Тройченко, канд. мед. наук; **Г. І. Дрожжина,** д-р мед. наук, професор;
А. Л. Молода, лікар; **Л. В. Доленко**

ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України»
Одеса (Україна)

E-mail: tlf2008@ukr.net

Актуальність. *Інфекційні виразки рогівки та кератити за даними ВОЗ є однією з основних причин втрати зору та сліпоти у світі. Незважаючи на велику кількість антимікробних препаратів, залишається актуальним пошук нових методів лікування, які можуть забезпечувати швидку та повну мікробоцидну та мікробостатичну активність з мінімальним токсичним впливом на організм для збереження зору при тяжких інфекційних захворюваннях рогівки.*

Мета. *Оцінити антимікробний впливу на суспензію Candida albicans та Fusarium spp. УФВ довжиною хвилі 365 нм та низькоенергетичного лазерного випромінювання 630-670 нм з використанням фотосенсибілізаторів (in vitro).*

Матеріал та методи. *Антимікробну активність препаратів вивчали стандартним диско-дифузійним методом (МВ9.95-143-2007) з використанням поживного середовища Мюллера Хинтона. Методики впливу: низькоенергетичне лазерне випромінювання (в клініці фотодинамічна терапія (ФДТ)) – на поверхню стерильного диска, який знаходився на поверхні поживного середовища з тест штамами культур Candida albicans та Fusarium spp. інстилювали 0,1% метиленового синього, потім протягом трьох хвилин проводили опромінювання диску низькоенергетичним лазерним випромінюванням 630-670 нм. При виконанні УФВ (в клініці кросслінкінг колагену (ККР) – інстилювали 0,1% рибофлавіну, потім протягом 10 хвилин проводили ультрафіолетове опромінювання диску на приборі UVX 2000 з довжиною хвилі 365нм.*

Результати. *За даними аналізу зон затримки росту на Candida albicans мав вплив як ФДТ, так і КРК. Достовірна різниця на 6,3мм зони затримки росту була при використанні комбінованого методу ФДТ+ КРК + флюконазол. На Fusarium spp. мав вплив і комбінований метод ФДТ+ КРК, так і в поєднанні з інтраконазолом. Достовірна різниця зони затримки росту була 4,2 мм та 7,8 мм відповідно.*

Висновки. *Встановлено, що запропонована комбінована методика УФВ довжиною хвилі 365нм з використанням фотосенсибілізатора 0,1% рибофлавіна та низькоенергетичного лазерного випромінювання 630-670 нм з використанням фотосенсибілізатора 0,1%метиленового синього має антимікробну дію на Candida albicans і на Fusarium spp в експерименті in vitro шляхом затримки зони росту грибкової флори. Ці експериментальні дослідження показали перспективність і потребують подальшого дослідження.*

Ключові слова:
ультрафіолетове випромінювання (УФВ), низькоенергетичне лазерне випромінювання, антимікробна дія, Candida albicans, Fusarium spp

Актуальність. Інфекційні захворювання рогівки можуть надавати глибокий і руйнівний вплив на зорову функцію. Інфекційні виразки рогівки та кератити, за даними ВОЗ, є однією з основних причин втрати зору та сліпоти у світі [5-7].

Незважаючи на велику кількість антимікробних препаратів, залишається актуальним якісне лікування і ефективна хіміотерапія для збереження зору при тяжких інфекційних захворюваннях рогівки [3, 7].

Підраховано, що тільки 50% кератитів загоюються з задовільним візуальним результатом, якщо своєчасна постановка діагнозу і початок відповідного антимікробного лікування затримуються [8].

Частота грибкових кератитів (ГК) складає 4,5-50% серед усіх кератитів за даними різних авторів. Недо-

© Тройченко Л. Ф., Дрожжина Г. І., Молода А. Л., Доленко Л. В., 2021

тримання гігієни та порушення режиму носіння контактних лінз посідає перше місце серед причин виникнення грибкових кератитів у розвинутих країнах Европи та Америки (37%). Друге місце посідає травма ока (35%). І на третьому місці – захворювання поверхні ока (29%). Збудниками ГК частіше всього являються дрожжи (Candida alb., Malassezia spp., Micosporum spp.) та плісняві гриби (Aspergillus spp., Cephalsporium spp., Mucor spp., Fusarium spp., Paecillomices spp. та інш.), при цьому останні визивають більш тяжкі ураження ока, які приводять до втрати органу зору [2, 5, 11, 13].

Лікування грибкових кератитів супроводжується важкими наслідками у зв'язку з недостатньо ефективним місцевим лікуванням і довготривалою системною терапією. Широке використання антибіотиків (зокрема фторхінолонів) призвело до підвищення резистентності бактерій до антибактеріальної терапії та стимулювало пошук нових методів лікування, які можуть забезпечувати швидку та повну мікробоцидну та мікробостатичну активність з мінімальним токсичним впливом на організм [5].

Рибофлавін, або вітамін В2, є природною сполукою і необхідною живильною речовиною для людини. У 1960-х роках японські вчені продемонстрували, що рибофлавін при впливі видимого або ультрафіолетового світла можна використовувати для інактивації вірусу тютюнової мозаїки (tobacco mosaic), що містить РНК. З 2000 року ведуться дослідження з використання рибофлавіну в якості фотосенсибілізатора для інактивації патогенів в плазмі, тромбоцитах і продуктах еритроцитів [9-16]. Результати дослідження показали, що він може діяти як фотосенсибілізатор, корисний для інактивації патогенів, які виявляються при інфекціях рогівки, через його специфічність до нуклеїнових кислот і його обмежену тенденцію до випадкового окислення. З іншого боку, відомо, що антимікробна активність ультрафіолетового (УФ) опромінення має спорицидний та віруліцидний ефект [17-19].

Кросслінкінг колагену рогівки (КРК) з у 2011 році на Всесвітньому конгресі офтальмології (Відень, Австрія) офіційно затверджений «золотим стандартом» у лікуванні прогресуючого кератоконуса. Під впливом ультрафіолетового світла (А спектру), що генерується лампою Зайлера, відбувається фотохімічна реакція іонізації і розпад молекул рибофлавіну з виділенням вільного атомарного кисню. Вільні кисневі радикали викликають перехресне зв'язування -CH і -CN груп в молекулах колагену, що викликає їх з'єднання в єдину тривимірну мережу. В результаті утворення множинних додаткових зв'язків між волокнами колагену рогівки значно збільшується її механічна міцність і жорсткість. Біомеханічні дослідження показали, що жорсткість рогівки після кросслінкінгу збільшується на 350-380%. Збільшення жорсткості та міцності рогівки починається відразу після процедури КРК і продовжується протягом двох років [9, 26].

За даними конфокальної біомікроскопії, проведеної після кросслінкінгу, було виявлено «виснаження» та апоптоз кератоцитів, що підштовхнуло до застосування кросслінкінгу колагену рогівки при інфекційних захворюваннях рогівки. З літературних джерел відомо, що лікувальний ефект КРК реалізується за рахунок його антимікробної, антиферментної, протизапальної дій, а також за рахунок посилення міцності властивостей строми і підвищення стійкості тканини рогівки до мікробних ферментів. Найбільш важливим виявляється антимікробний ефект, який виникає за рахунок взаємодії УФВ з рибофлавіном [16].

За результатами експериментальних досліджень авторів з США 2008 р. щодо групи бактерій (Pseudomonas aeruginosa [PA], Staphylococcus aureus [SA], Staphylococcus epidermidis [SE]) і Streptococcus pneumoniae (SP), показана ефективність застосування кросслінкінгу з фотосенсибілізатором рибофлавіном в пригніченні даних збудників. Однак застосування даного методу лікування по відношенню до Candida albicans (C.a.) ефекту не виявило [17].

Більшість авторів відзначають виражений ефект КРК при лікуванні кератитів і виразок бактеріальної етіології. Дані про ефективність КРК при лікуванні грибкових і акантамебних кератитів вельми суперечливі [17-33]. Відомостей про лікування кератитів і виразок рогівки змішаної етіології методом КРК недостатньо. У зв'язку з цим пошук нових комбінованих методів лікування цієї тяжкої патології рогівки являється актуальним.

Для комплексного лікування бактеріальних та грибкових кератитів з 2012 рр. в офтальмології використовується антимікробна фотодинамічна терапія (ФДТ) з фотосенсибілізатором метиленового синього. Експериментально було підтверджено ефективність лікування ФДТ з розчином 0,1% метиленового синього і низькоенергетичним лазерним випромінюванням 630-670 нм (НЕЛВ) на моделі грибкового кератиту та на моделі гострого бактеріального ендофтальміту. Встановлена клінічна ефективність запропонованого нового методу лікування при важких формах грибкового кератиту, що підтверджується досягненням фунгіцидного ефекту на другому тижні лікування з позитивною клінічною динамікою [1, 2, 4].

Ідея використання комбінованого методу лікування – кросслінкінгу колагену рогівки з подальшим використанням фотодинамічної терапії з метиленовим синім базується на дії УФВ на генетичний матеріал мікробів та на фунгіцидному та бактерицидному впливу ФДТ. Слід зазначити, що дані літератури відносно ефективності КРК при інфекційних кератитах аналізують окремі випадки, які відрізняються етіологією збудників, глибиною та важкістю ураження рогівки. У зв'язку з цим, проведення експериментальних досліджень щодо впливу ультрафіолетового випромінювання з включенням 0,1% рибофлавіну (кросслінкінг) та в комбінації з низько енергетичним лазерним ви-

промінюванням 630-670 нм (фотодинамічна терапія) з розчином 0,1% метиленового синього при грибкових кератитах в експерименті in vitro та in vivo являється актуальною задачею в офтальмології.

Мета. Оцінити in vitro антимікробний вплив на грибкову флору Candida albicans та Fusarium spp. ультрафіолетового випромінювання довжиною хвилі 365 нм з використанням фотосенсибілізатора 0,1% рибофлавина та низькоенергетичного лазерного випромінювання 630-670 нм з використанням фотосенсибілізатора 0,1% метиленового синього.

Матеріал та методи

Антимікробну активність препаратів вивчали стандартним диско-дифузійним методом (МВ9.95-143-2007) з використанням поживного середовища Мюлера Хінтона. Щільне поживне середовище готували відповідно до інструкції виробника, розливали у чашки Петрі. Як тест-штами використовували культури мікроорганізмів, виділені з коньюнктивальної порожнини ока хворих: 1) Candida albicans (CA); 2) Fusarium spp (FS). З вище перелічених культур мікроорганізмів готували мікробну суспензію в концентрації 1,5 х 108 КОЄ/куб.см, що відповідає стандарту каламутності 0,5 по МакФарланду (МВ 9.95-143-2007). Контроль оптичної густини суспензії здійснювали за допомогою денситометра. Стандартний інокулюм наносили піпеткою на поверхню чашки Петрі з поживним середовищем в об'ємі 1-2 см³. При відкритті чашки підсушували при кімнатній температурі протягом 10-15 хв. На поверхню поживного середовища наносили стерильний диск та диск з флюконазолом та ітраконазолом в якості контролю. Аплікацію дисків проводили за допомогою стерильного пінцета.

Методики впливу. Низькоенергетичне лазерне випромінювання (в клініці фотодинамічна терапія ФДТ) полягало в наступному. На поверхню стерильного диска, який знаходився на поверхні поживного середовища з тест штамами культур мікроорганізмів, інстилювали 0,1% метиленового синього до повного покриття диску. Після цього протягом трьох хвилин проводили опромінювання диску низькоенергетичним лазерним випромінюванням 630-670 нм.

Згідно методики впливу ультрафіолетового випромінювання (в клініці кросслінкінг колагену КРК) на поверхню стерильного диска, який знаходився на поверхні поживного середовища з тест штамами культур мікроорганізмів, інстилювали 0,1% рибофлавіну до повного покриття диску. Після цього протягом 10 хвилин проводили ультрафіолетове опромінювання диску на приладі UVX 2000 з довжиною хвилі 365 нм.

Експериментальні методики складалися з впливу на культуру Candida albicans, Fusarium spp.: а) фотодинамічна терапія (ФДТ); б) кросслінкінг колагену (КРК); в) ФДТ+ КРК; г) ФДТ+ CLX+ флюконазол (на Candida albicans) чи + ітраконазол (на Fusarium spp.).

В якості контролю використовували диски з флюконазолом для Candida albicans та диски з інтраконазолом для Fusarium spp., які наносилися на поживну речовину в чашку Петрі на відстані не менш, ніж 5 см від диску експерименту.

Відразу після проведення експериментальних методик та аплікації дисків чашки Петрі вміщували в термостат догори дном і інкубували при температурі 35°С протягом 24 годин.

Облік результатів. Після інкубації чашки поміщали догори дном на темну матову поверхню так, щоб світло падало на них під кутом 45°С (облік у відбитому світлі) та проводили візуальну оцінку наявності зон затримки росту мікроорганізмів довкола досліджуваних речовин і дисків з антимікробними препаратами. Розмір зон затримки росту вимірювали в мм за допомогою лінійки- шаблону для вимірювання зон затримки росту мікроорганізмів (рис. 1, 2).

Аналіз даних виконували за допомогою пакета статистичних програм Statistica 9.0. Статистичну достовірність відмінностей визначали за критерієм Стьюдента.

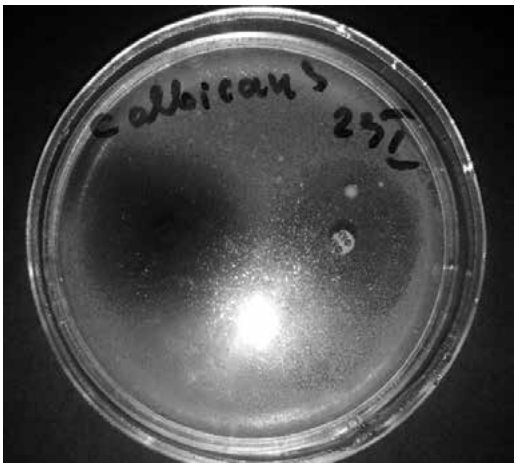

Рис. 1. Зони затримки росту

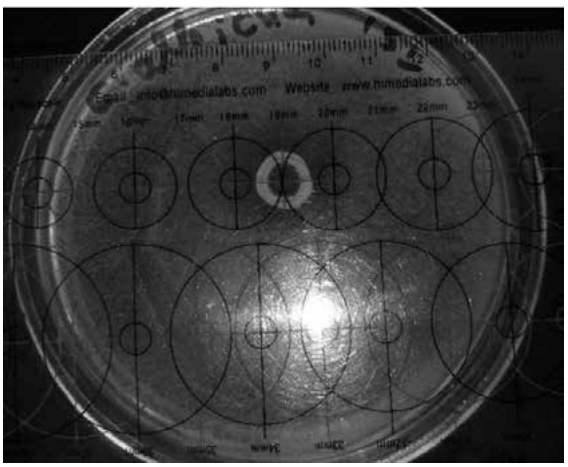

Рис. 2. Вимірювання зони затримки росту

Результати

В результаті проведення експериментальних методик були отриманні наступні результати.

На Candida albicans мав вплив як ФДТ, так і КРК. Після впливу ФДТ зона затримки росту була від 15 до 28 мм (М 21,9 ± SD 4,7 мм), але контрольна серія з флюконазолом мала значення від 28 до 30 (М 29,6± SD 0,69 мм), що на 7,7 мм більше від показників експерименту (р =0,001).

Після впливу КРК зона затримки росту в експерименті була від 0 до 19 мм (М 9,1 ± SD 9,6 мм), а в контролі – від 30 до 34мм (М 31,1 ± SD 1,37 мм), що достовірно більше на 22 мм (р =0,000) (табл.1).

Після комбінованого впливу фотодинамічної терапії в поєднанні з кросслінкінгом (ФДТ+ КРК) зона затримки росту була від 14 до 30 мм (М 22,4 ± SD 7,27 мм), що на 8,3 мм менше, ніж в контролі – М 30,7± SD 1,16 мм (від 29 до 32 мм).

Найбільша зона затримки росту була при використанні комбінованого методу ФДТ+ КРК + флюконазол – від 36 до 38 мм (М 36,9± SD 0,87 мм). В контролі з флюконазолом зона затримки росту була на 6,3 мм достовірно менше і склала від 29 до 32 мм (М 30,6± SD 0,96 мм) (табл. 2).

При проведенні експеримента з Fusarium spp. були отриманні наступні результати : ФДТ мав вплив на збудник М 8,8± SD 6,16 мм (від 0 до 14 мм), а в контролі з інтраконозолом були отриманні результати затримки зони росту М 14,5± SD 1,43 мм (від 13 до 17 мм),р=0,01.

Після впливу на Fusarium spp. ультрафіолетового випромінювання (КРК) отримали наступні результати : в експерименті затримка зони росту М 9,7± SD 8,36 мм (від 0 до 17 мм), а в контролі М 17,3± SD 1,3 мм (від 15 до 19 мм), р=0,01 (табл. 3).

Комбінований вплив низькоенергетичного лазерного випромінювання (ФДТ) та ультрафіолетового випромінювання (КРК) на Fusarium spp. привів до достовірної різниці затримки зони росту на 4,2 мм в експерименті М 32,2± SD 3,61 мм (від 25 до 35 мм) в порівнянні з контролем М 28,0± SD 2,0 мм (від 24 до 28 мм), р=0,004.

Комбінована методика впливу ФДТ +КРК + ітраконазол на Fusarium spp. показала достовірну різницю затримки зони росту в експерименті М 27,9± SD 6,99 мм (від 20 до 40 мм) на 7,8 мм в порівнянні з контролем М 20,1± SD 3,95 мм (від 17 до 31мм), р=0,006 (табл. 4, рис. 3).

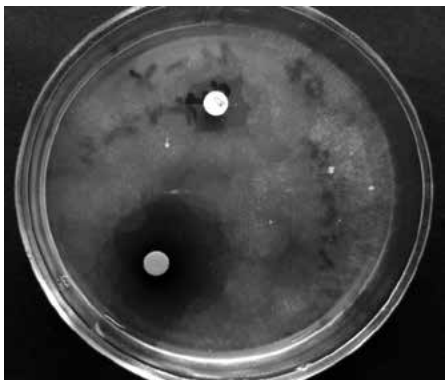

Рис. 3. Зони затримки росту Fusarium spp. комбінований метод ФДТ+ КРК+ ітраконазол .

Таблиця 1. Показники зон затримки росту після впливу ФДТ та КРК на Candida albicans (M±SD)

Кількість досліджень	Методика впливу	Контроль	Експеримент	Різниця	p
10	ФДТ	29, 6± 0,69 мм	21,9 ± 4,7 мм	7,7 мм	0,001
10	КРК	31,1 ± 1,37 мм	9,1 ± 9,6 мм	22,0 мм	0,000

Таблиця 2. Показники зон затримки росту після комбінованих методик впливу на Candida albicans (M±SD)

Кількість досліджень	Методика впливу	Контроль	Експеримент	Різниця	p
10	ФДТ+КРК	30,7 ± 1,16 мм	22,4 ± 7,27 мм	8,3 мм	0,022
10	ФДТ+КРК+ флюконазол	30,6 ± 0,96 мм	36,9 ± 0,87 мм	6,3 мм	0,000

Таблиця 3. Показники зон затримки росту після впливу ФДТ та КРК на Fusarium spp. (M±SD)

Кількість досліджень	Методика впливу	Контроль	Експеримент	Різниця	p
10	ФДТ	14,5 ± 1,43 мм	8,8 ± 6,16 мм	5,7 мм	0,01
10	КРК	17,3 ± 1,3 мм	9,7 ± 8,36 мм	7,6 мм	0,01

Таблиця 4. Показники зон затримки росту після комбінованих методик на Fusarium spp. (M±SD)

Кількість досліджень	Методика впливу	Контроль	Експеримент	Різниця	p
10	ФДТ+ КРК	28,0 ± 2,0 мм	32,2 ± 3,61 мм	4,2 мм	0,004
10	ФДТ+ КРК + ітраконазол	20,1 ± 3,95 мм	27,9 ± 6,99 мм	7,8 мм	0,006

Обговорення

В результаті проведеного експерименту на тест збудниках Candida albicans було виявлено зони затримки росту як при застосуванні низькоенергетичного лазерного випромінювання, так і в комбінації з УФВ та флюконазолом. Експеримент з Fusarium spp. показав зону затримки росту як при комбінованому методі лікування ФДТ +КРК, так і при комбінації з інтраконазолом. Ми запропонували in vitro використання комбінованого впливу на грибкові збудники ураження рогівки у зв'язку з тим, що в літературі не знайшли чіткого алгоритму лікування такої тяжкої патології грибкового ураження рогівки.

Said et al. (2014) в своїх публікаціях показали ефективне використання терапевтичного кросслінкінгу колагену рогівки за методикою PACK-CXL в лікуванні грибкового кератиту на 40 хворих [33].

Shetty et al. (2014) відмітили в 50% (на 3 очах) ефективне застосування кросслінкінгу при неглибокому грибковому кератиті, а при глибоких ураженнях рогівки з пошкодженням ендотеліальних клітин PACK-CXL не мав результату [29].

Saglk et al. (2013) опублікував успішний клінічний приклад застосування двох процедур PACK-CXL з 3-х тижневою перервою при грибковій виразці рогівки, яка не піддавалась протигрибковій стандартній терапії [30].

Arboleda et al. (2014) в експерименті показав ефективність фотодинамічної терапії з сенсибілізатором «рожевим бенгальським» на грибкову культуру, виділену з поверхні рогівки пацієнтів з грибковим кератитом [31].

Зборовська О.В. в ряді робіт (2009-2012 рр.) як експериментальних, так і клінічних довела ефективність фотодинамічної терапії з 0,1% розчином метиленового синього в лікуванні грибкового кератиту, викликаного Candida albicans [1, 2, 4].

Prafulla R Maharana et al. (2016) та Pranita Sahay et al. (2019) в оглядах по діагностиці та лікуванню грибкових кератитів в сучасній медицині зробили висновок, що лікування грибкового кератиту залишається проблемою для офтальмології. Нові грибкові збудники та стійкість до існуючої протигрибкової терапії приводять до негативного прогнозу при грибковому кератиті [8, 32].

Новітні протигрибкові засоби та новітні методи цілеспрямованих систем доставки препаратів можуть бути використані для лікування резистентних випадків кератитів. Наночастинки та антимікробні пептиди показали перспективність у експериментальних дослідженнях.

Автори акцентували на необхідності пошуку подальших методик ефективного лікування грибкових кератитів.

Запропонована нами комбінована методика УФВ довжиною хвилі 365нм з використанням фотосенсибілізатора 0,1% рибофлавіну та низькоенергетичного лазерного випромінювання 630-670 нм з використанням фотосенсибілізатора 0,1%метиленового синього має антимікробну дію на Candida albicans і на Fusarium spp в експерименті in vitro шляхом затримки зони росту грибкової флори. Ці експериментальні дослідження показали перспективність і потребують подальшого дослідження в офтальмології.

Література

1. **Зборовская А.В.** Фотодинамическая терапия с использованием метиленового синего в качестве сенсибилизатора при лечении грибкового кератита / А.В. Зборовская // Офтальмол. журн. – 2011. – №2. – С. 54-58.
2. **Зборовская А.В.** Эффективность фотодинамической терапии с 0,1% метиленовым синим и низкоэнергетическим лазерным излучением с длиной волны 630-670нм у больных грибковыми кератитами / А.В. Зборовская, И.С. Горянова, А.Н. Курилюк // Офтальмол. журн. – 2012. – №4. – С.12-15.
3. **Нероев В.В., Петухова А.Б., Данилова Д.Ю., Селиверстова К.Е., Гундорова Р.А.** Кросслинкинг роговичного коллагена в лечении трофических и бактериальных язв роговицы // Росс. мед. журнал. – 2013. – №2. – С.25-27.
4. **Пасечникова Н.В.** Фотодинамическое воздействие метиленового синего на культуру Escherichia coli при его активации лазерным излучением / Н.В. Пасечникова, А.В. Зборовская, Т.Б. Кустрин // Офтальмол. журн. – 2009. – №3. – С.60-63.
5. **Alio J. L.** Corneal cross linking and infectious keratitis: a systematic review with a meta-analysis of reported cases / Alio J.L., Abbouda A., Valle D.D., Del Castillo J.M., Fernandez J.A. // J Ophthalmic Inflamm Infect. – 2013. – Vol. (1). – P.47.
6. **Gower E.W.** Trends in fungal keratitis in the United States, 2001 to 2007 / Gower E.W., Keay L.J., Oechsler R.A., Iovieno A., Alfonso E.C., Jones D.B. et al.// Ophthalmology. – 2010. – Vol.117. – P. 2263-7.
7. Garg P. Fungal, mycobacterial, and nocardia infections and the eye: An update // Eye (Lond). – 2012. – Vol.26. – P.245-51.
8. **Maharana P.K.** Recent advances in diagnosis and management of Mycotic Keratitis / Maharana P.K., Sharma N., Nagpal R. et al. // Indian J Ophthalmol. – 2016. –Vol.64. – P.346-57.
9. **Hafezi F., Randelman B.J**. Corneal collagen crosslinking. – SLACK Incorporated, 2013. – P.43-63.
10. **Revankar S.G**. Melanized fungi in human disease / Revankar SG, Sutton D.A. // Clin Microbiol Rev. – 2010. – Vol.23. – P.884-928.
11. **Spoerl E.** Thermomechanical behavior of collagen-crosslinked porcine cornea / Spoerl E., Wollensak G., Dittert D., Seiler T. // Ophthalmologica. – 2004. – Vol.218(2) – P.136-140.
12. **Spoerl E**. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion / Spoerl E., Wollensak G., Seiler T. // Curr Eye Res. – 2004. –Vol.29(1) –P. 35-40.
13. **Hafezi F., Randelman B.J**. Corneal collagen crosslinking. – SLACK Incorporated, 2013. – P.43-104.

14. **Chan E.** Treatment of infectious keratitis with riboflavin and ultraviolet-A irradiation / Chan E., Snibson G.R., Sullivan L. // J Cataract Refract Surg. – 2014.– Vol.40(11). – P.1919-1925.
15. **Tschopp M.** Impact of Corneal Cross-linking on Drug Penetration in an Ex Vivo Porcine Eye Model / Tschopp M., Stary J., Frueh B.E., Thormann W., Bocxlaer V., Tappeiner C. // Cornea. – 2012.– Vol.31(3). – P.222-226.
16. **Stewart M.** Cross-Linking with Ultraviolet-A and Riboflavin Reduces Corneal Permeability / Stewart M., Lee O.T., Wong F.F., Schultz D.S., Lamy R. // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2011. – Vol.52(12). – P.9275-9278.
17. **Martins SA.** Antimicrobial efficacy of riboflavin/UVA combination (365 nm) in vitro for bacterial and fungal isolates: a potential new treatment for infectious keratitis / Martins S.A., Combs J.C., Noguera G., Camacho W., Wittmann P., Walther R., Cano M., Dick J., Behrens A. // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2008. – Vol.49(8). – P.3402-3408.
18. **Schrier A**. In vitro antimicrobial efficacy of riboflavin and ultraviolet light on Staphylococcus aureus, methicillin-resistant Staphylococcus aureus, and Pseudomonas aeruginosa / Schrier A., Greebel G., Attia H., Trokel S., Smith E.F. // J Refract Surg. – 2009. – Vol.25(9). – P.S799-S802.
19. **Sauer A.** In vitro efficacy of antifungal treatment using riboflavin/UV-A (365 nm) combination and amphotericin B / Sauer A., Letscher-Bru V., Speeg-Schatz C., Touboul D., Colin J., Candolfi E., Bourcier T. // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2010. – Vol.51(8). – P.3950-3953.
20. **Galperin G.** Treatment of fungal keratitis from Fusarium infection by corneal cross-linking / Galperin G., Berra M., Tau J., Boscaro G., Zarate J., Berra A. // Cornea. – 2012. – Vol.31(2). – P.176-180.
21. **Ferrari T.** Keratitis treated with ultraviolet A/riboflavin corneal cross-linking: a case report / Ferrari T., Leozappa M., Lorusso M., Epifani E., Ferrari L. // Eur J Ophthalmol. – 2009. –Vol.19(2). – P. 295-297.
22. **Al-Sabai N.** UVA/riboflavin crosslinking as treatment for corneal melting / Al-Sabai N., Koppen C., Tassignon M.J. // Bull Soc Belge Ophtalmol. – 2010. – Vol.315 – P.13-17.
23. **Iseli H.P.** Ultraviolet A/riboflavin corneal cross-linking for infectious keratitis associated with corneal melts / Iseli H.P., Thiel M.A., Hafezi F., Kampmeier J., Seiler T. // Cornea. – 2008. –Vol.27(5). – P.590-594.
24. **Ehlers N.** Riboflavin-ultraviolet light induced cross-linking in endothelial decompensation / Ehlers N., Hjortdal J. // Acta Ophthalmol. – 2008. – Vol.86(5). – P.549-551.
25. **Makdoumi K.** Infectious keratitis treated with corneal cross-linking / Makdoumi K., Mortensen J., Crafoord S. // Cornea. – 2010. – Vol.29(12). – P.1353-1358.
26. **Spoerl E.** Safety of UVA—Riboflavin Cross-Linking of the Cornea / Spoerl E., Mrochen M., Sliney D., Trokel S., Seiler T. // Cornea. – 2007. – Vol.26(4). –P.385-389.
27. **Li Z.** Riboflavin/ultraviolet lightmediated crosslinking for fungal keratitis / Li Z., Jhanji V., Tao X., Yu H., Chen W., Mu G. // Br J Ophthalmol. – 2013. – Vol.97(5). – P.669-671.
28. **Makdoumi K.** UVAriboflavin photochemical therapy of bacterial keratitis: a pilot study / Makdoumi K., Mortensen J., Sorkhabi O., Malmvall B.E., Crafoord S. // Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. – 2012. – Vol.250(1). – P.95-102.
29. **Shety R.** Collagen crosslinking in the management of advanced non resolving microbial keratitis / Shety R., Nagaraja H., Jayadev C., Shivanna Y., Kugar T. // Br J Ophthalmol. – 2014. – Vol. 98. – P.1033 5.
30. **Saglk A.** Ultraviolet A and riboflavin therapy as an adjunct in corneal ulcer refractory to medical treatmen / Saglk A., Uçakhan O.O., Kanpolat A. // Eye Contact Lens. – 2013. – Vol.39. – P.413 5.
31. **Arboleda A.** Assessment of rose bengal versus riboflavin photodynamic therapy for inhibition of fungal keratitis isolates / Arboleda A., Miller D., Cabot F., Taneja M., Aguilar M.C., Alawa K. et al. // Am J Ophthalmol. – 2014. – Vol.158. – P. 64 70.
32. **Pranita Sahay.** Pharmacologic therapy of mycotic keratitis. / Pranita Sahay, Deepali Singhal , Ritu Nagpal, Prafulla K Maharana, et al. // Surv Ophthalmol. – 2019. – Vol.64(3). –P.380-400.
33. **Said DG.** Collagen cross-linking with photoactivated riboflavin (PACK-CXL) for the treatment of advanced infectious keratitis with corneal melting / Said D.G., Elalfy M.S., Gatzioufas Z., El-Zakzouk E.S., Hassan M.A., Saif M.Y. et al.// Ophthalmology. – 2014. – Vol.121. –P.1377-82.

Автори засвідчують про відсутність конфлікту інтересів, які б могли вплинути на їх думку стосовно предмету чи матеріалів, описаних та обговорених в даному рукопису.

Поступила 11.01.2021

Изучение антимикробного влияния in vitro на грибковую флору Candida albicans и Fusarium spp. ультрафиолетового облучения длиной волны 365 нм и низкоенергетического лазерного облучения 630-670 нм с использованием фотосенсебилизаторов

Тройченко Л.Ф., Дрожжина Г.И., Молодая А.Л., Доленко Л.В.

ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМН Украины»; Одесса (Украина)

***Актуальность**. Инфекционные язвы роговицы и кератит по данным ВОЗ является одной из основных причин потери зрения и слепоты в мире. Несмотря на большое количество антимикробных препаратов остается актуальным поиск новых методов лечения, которые могут обеспечивать быструю и полную микробоцидную и микробостатическую активность с минимальным токсическим воздействием на организм для сохранения зрения при тяжелых инфекционных заболеваниях роговицы.*

***Цель.** Оценить антимикробное влияние на суспензию Candida albicans и Fusarium spp. УФО длиной волны 365нм и низкоенергетического лазерного облучения 630-670нм с использованием фотосенсебилизаторов (in vitro).*

Материал и методы. *Антимикробную активность препаратов изучали стандартным диско-диффузным методом (МВ9.95-143-2007) с использованием питательной среды Мюллера-Хинтона.*

Методики воздействия: Фотодинамическая терапия (ФДТ) – на поверхность стерильного диска, который находился на поверхности питательной среды с тест штаммами культур Candida albicans и Fusarium spp. инстиллировали 0,1% метиленового синего, затем в течение 3-х минут проводили облучение диска низкоэнергетическим лазерным излучением 630-670 нм. При выполнении кросслинкинга коллагена (КРК) – инстиллировали 0,1% рибофлавин, затем в течение 10 минут проводили ультрафиолетовое облучение диска на приборе UVX 2000 с длиной волны 365 нм.

Результаты. *По данным анализа зон задержки роста на Candida albicans имели влияние как ФДТ, так и КРК. Достоверная разница на 6,3 мм зоны задержки роста была при использовании комбинированного метода ФДТ + КРК + флуконазол.*

На Fusarium spp. имел влияние как комбинированный метод ФДТ + КРК, так и в сочетании с интраконазолом. Достоверная разница зон задержки роста была 4.2 мм и 7,8 мм соотвественно.

Выводы. *Установлено, что предложенная комбинированная методика фотодинамической терапии в сочетании с кросслинкингом коллагена обладает антимикробным действием на Candida albicans и на Fusarium spp в эксперименте in vitro. Полученные в эксперименте результаты показали перспективность предложенного комбинированного метода лечения, что подтверждается задержкой зоны роста Candida albicans и Fusarium spp. и требует дальнейшего изучения в офтальмологии для лечения местных инфекций.*

Ключевые слова: *УФО, низкоэнергетическое лазерное облучение, антимикробное действие, Candida albicans, Fusarium spp.*