

ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО НА КУЛЬТУРУ ESCHERICHIA COLI, ПРИ ЕГО АКТИВАЦИИ ЛАЗЕРНЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ

Н. В. Пасечникова, д-р мед. наук, **А. В. Зборовская**, канд. мед. наук,

Т. Б. Кустрин

ГУ "Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова АМН Украины"

Вивчався вплив сумісного використання лазерного випромінювання та метиленового синього (МС) як фотосенсибілізатора на культуру Escherichia coli.

Використовували добові культури. Концентрації МС дорівнювали 0,2%, 0,1% та 0,05%. Активізація суспензії клітин з МС здійснювалась за допомогою діодного лазера з довжиною хвилі 630 нм впродовж 3 чи 5 хвилин.

Показано, що ріст E. coli незначно пригноблюється при використанні МС у комбінації з лазером.

Через 24 години максимальне пригноблення росту було в групі без центрифугування з застосуванням 0,05% МС та тривалості лазерного випромінювання 3 хв. МС не проходить в клітину цих мікроорганізмів, що обумовлене будовою їх стінки. Для підвищення проникності стінки E. coli необхідно використовувати провідники, що буде вивчатися в подальших дослідженнях.

Ключевые слова: метиленовый синий, лазер, патогенный штамм Escherichia coli.

Ключові слова: метиленовий синій, лазер, патогенний штам Escherichia coli.

В последние годы заметны достижения в области антибактериальной терапии. Однако проблема инфекционных заболеваний остается одной из главных во многих областях медицины. Сегодня наиболее агрессивными и устойчивыми к антибактериальным препаратам являются такие широко распространенные патогены, как E. coli, S. aureus, стрептококки [1, 2]. При тяжелой форме инфекции — сепсисе — наиболее часто встречающимися патогенными микроорганизмами являются стафилококки, грибы, энтерококки [3, 4]. Устойчивость возбудителей к антибиотикам и необходимость проведения системного лечения создают множество вторичных проблем (проблемы нефро-, гепато- и нейротоксичности). Одна из них — проблема системной токсичности антибактериальных препаратов. Она может быть рассмотрена с точки зрения «волшебной пули» [5], гипотетически представляющей антимикробное средство, целевым образом доставляемое в очаг поражения и взаимодействующее только с возбудителем инфекционного заболевания, но не с тканями и клетками организма-хозяина. В данном контексте таким средством представляется фотодинамическая терапия.

Целью исследования было изучение влияния сочетанного применения водного раствора метиленового синего как фотосенсибилизатора и лазерного излучения с длиной волны 630 нм на патогенный штамм Escherichia coli in vitro.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ. Экспериментальное исследование сочетанного применения лазерного излучения и метиленового синего (МС) как фотосенсибилизатора проводили на культуре патогенного тест-штамма Escherichia

coli. Сохраняли тест-штаммы на поверхности скошенного мясо-пептонного агара (МПА) при температуре 4°C. Для эксперимента использовались суточные культуры, которые выращивали в пробирках на скошенном МПА при 37°C. Раствор метиленового синего в концентрациях 0,05%, 0,1% и 0,2% готовили в дистиллированной воде.

При изучении темного воздействия вещества, то есть влияния МС на рост тест-штамма без лазерного облучения, готовили жидкую среду Гисса с глюкозой без индикатора Андерееде. Среду разливали в пробирки по 1 мл. Количество пробирок составило 4 для каждой концентрации МС. Пробирки со средой стерилизовали в автоклаве при 0,5 атм. Культуру тест-микроорганизмов, выращенных на скошенном МПА в пробирках, смывали стерильным физиологическим раствором. Суспензию разводили стерильным физиологическим раствором до концентрации 2×10^4 клеток/мл. Из полученного инокулята отбирали по 50 мкл и вносили в каждую пробирку. Конечная концентрация клеток в 1 мл среды составляла 1×10^3 клеток/мл.

Культуру с метиленовым синим инкубировали в термостате при температуре 37°C на протяжении 24 и 48 час. Интенсивность роста тест-штамма определяли по оптической плотности культуры, которую измеряли на спектрофотометре "Spekol-10" (Германия) при длине волны 540 нм. Контролем служили культуры микроорганизмов, параллельно выращенные на среде Гисса без добавления исследуемого вещества (с концентрацией 1×10^3 клеток/мл). Оценка интенсивности роста культуры по данным оптической плотности раствора проводилась через 24 и 48 час. после воздействия на пробирки лазерным облучением без последующего центрифугирования или с ним. Экспериментальное исследование проводилось в трех повторах для каждой концентрации МС.

Определение фотоиндуцированного влияния метиленового синего на микроорганизмы.

Готовили суспензию клеток тест-микроорганизмов аналогично описанной методике. В пробирки с 1 мл стерильного физиологического раствора, который содержал 0,05%, 0,1% или 0,2% МС, вносили по 50 мкл полученной суспензии. Таким образом, в пробирках получали концентрацию 10^7 клеток/мл.

Суспензию клеток с метиленовым синим инкубировали 30 мин. при комнатной температуре для связывания МС с клетками. Активацию исследуемого вещества осуществляли с помощью диодного лазера с длиной волны 630 нм в течение 3 или 5 мин. Активацию метиленового синего в растворе осуществляли с помощью диодного лазера с длиной волны 630 нм в течение 3 или 5 мин. Выбор длины лазерного излучения был обусловлен тем, что в пределах 620-670 нм находится спектр активации МС как фотосенсибилизатора (т. е. его перевод в возбужденное состояние) [6].

Облученные суспензии оставляли на 1 час при комнатной температуре, после чего разводили стерильным физиологическим раствором до концентрации 10^3 клеток/мл. Из последнего разведения отбирали 50 мкл и вносили в стерильную среду Гисса с глюкозой без индикатора (вариант без центрифугирования). Параллельно исходную суспензию микроорганизмов центрифугировали (1200 об/мин., 20 мин.), после чего надосадочную жидкость сливали и стерильным физиологическим раствором доводили до концентрации 10^3 клеток/мл, отбирая 50 мкл в стерильную питательную среду (вариант с центрифугированием).

Центрифугирование культуры с метиленовым синим без/после облучения проводилось для отделения суспензии культуры от МС, находящегося в жидкой среде. В варианте после центрифугирования дальнейшее культивирование суспензии микроорганизмов проводилось без присутствия МС в питательной среде, однако МС находился в клетке микроорганизма.

В варианте без последующего центрифугирования культивирование *Escherichia coli* проводилось с присутствием МС в питательной среде, однако, учитывая методику, концентрация МС была незначительной. Также следует учитывать тот факт, что МС выводится из тканей глаза через 24 часа, таким образом условия проведения эксперимента *in vitro* в определенной мере сопоставимы с условиями, в которых находится микроорганизм в тканях глаза, прокрашенных МС [1]. Количество повторов, условия инкубации и оценка результатов аналогичны предыдущей методике. Все эксперименты проводили в трех повторах.

В качестве контроля использовали культуру микроорганизмов после облучения без исследуемого вещества для определения влияния самого лазера на рост культуры (Кл), а также культуру, выращенную без МС и без лазера (К). Определяя влияние лазерного излучения на рост культуры *Escherichia coli*, проводили облучение пробирок с концентрацией клеток 1×10^3 клеток/мл в течение 3 и 5 минут. Количество повторов и условия инкубации те же. Оценка интенсивности роста культуры по данным оптической плотности раствора проводилась через 24 и 49 час. после воздействия на пробирки лазерным облучением без последующего центрифугирования или с ним. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы «OpenOffice.org.calc».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. В контрольных пробирках (К) рост культуры *Escherichia coli* составил через 24 часа $0,443 \pm 0,017$ ($\delta = 0,09$) и через 48 часов $0,507 \pm 0,078$ ($\delta = 0,27$).

При изучении влияния МС без облучения на рост одного из ярких представителей грам-негативных микроорганизмов *Escherichia coli*, установлено, что после центрифугирования статистически достоверное подавление роста микроорганизмов через 24 часа определялось в группе с 0,05% МС ($p < 0,05$). Через 48 часов статистически достоверное подавление роста установлено в группах с 0,05% и 0,2% МС ($0,32 \pm 0,01$ и $0,47 \pm 0,01$ соответственно, $p < 0,05$). В остальных группах подавления роста микроорганизмов не отмечалось (табл. 1).

Таблица 1

Оптическая плотность культуры *Escherichia coli* в присутствии метиленового синего после центрифугирования (отн. ед.)

Концентрация метиленового синего, %	$M \pm m$	δ
24 часа		
0,05	$0,318 \pm 0,921$	0,04
0,1	$0,40 \pm 0,046$	0,16
0,2	$0,37 \pm 0,026$	0,09
48 часов		
0,05	$0,32 \pm 0,012$	0,02
0,1	$0,53 \pm 0,03$	0,08
0,2	$0,47 \pm 0,016$	0,04

В группе без центрифугирования при воздействии МС подавление роста микроорганизмов было в группах с использованием 0,05% и 0,2% МС как через 24, так и через 48 часов ($p < 0,05$). Особенно выраженным было подавление роста в пробирках с 0,2% МС ($0,32 \pm 0,04$) при оценке результатов через 24 часа (табл. 2).

Таблица 2

Оптическая плотность культуры *Escherichia coli* в присутствии метиленового синего без центрифугирования (отн. ед.)

Концентрация метиленового синего, %	$M \pm m$	δ
24 часа		
0,05	$0,038 \pm 0,07$	0,015
0,1	$0,46 \pm 0,02$	0,09
0,2	$0,32 \pm 0,04$	0,14
48 часов		
0,05	$0,36 \pm 0,016$	0,03
0,1	$0,55 \pm 0,08$	0,23
0,2	$0,36 \pm 0,017$	0,04

При изучении воздействия лазерного излучения с длиной волны 630 нм на рост культуры *E. coli* (K_d) установлено, что через 24 часа статистически достоверной разницы не наблюдалось по сравнению с контролем при облучении через 3 и 5 мин. соответственно ($0,424 \pm 0,013$ и $0,433 \pm 0,033$, $p >$

0,05). Через 48 часов установлена статистически достоверная стимуляция роста микроорганизмов ($0,606 \pm 0,014$ и $0,598 \pm 0,043$), $p < 0,05$) по сравнению с контролем (табл. 3).

Таблица 3

Оптическая плотность культуры *Escherichia coli* после лазерного воздействия (отн. ед.)

Время лазерного облучения, мин.	M ± m	δ
24 часа		
3 мин.	$0,424 \pm 0,013$	0,047
5 мин.	$0,433 \pm 0,033$	0,12
48 часов		
3 мин.	$0,606 \pm 0,014$	0,05
5 мин.	$0,598 \pm 0,043$	0,15

Оценка фотодинамических свойств МС

Изучение фотодинамического влияния МС на *E. coli* проводилась при воздействии лазером с длиной волны 630 нм и длительностью облучения 3 и 5 мин. Далее пробирки делились на две группы — с последующим центрифугированием и без него. Оценка результатов проводилась через 24 и 48 часов по оптической плотности культуры в пробирках.

В группе после центрифугирования через 24 часа статистически достоверное подавление роста наблюдалось в пробирках с использованием 0,1% МС при длительности облучения 3 мин. ($0,358 \pm 0,01$, $p < 0,01$) и 0,2% МС с лазерным воздействием 5 мин. ($0,310 \pm 0,04$, $p < 0,05$). В других пробирках статистически достоверного подавления роста микроорганизмов не установлено. При определении результатов через 48 часов определено статистически достоверное подавление роста микроорганизмов при облучении в течение 3 мин. и концентрациях МС 0,05%, 0,1% и 0,2%. При длительности облучения 5 мин. отмечалась стимуляция роста микроорганизмов во всех группах (табл. 4).

Таблица 4

Оптическая плотность *Escherichia coli* в присутствии метиленового синего после лазерного воздействия после центрифугирования (отн. ед.)

Концентрация метиленового синего, %	Время воздействия лазером, мин.			
	3		5	
	M ± m	δ	M ± m	δ
24 часа				
0,05	$0,378 \pm 0,03$	0,06	$0,39 \pm 0,013$	0,02
0,1	$0,358 \pm 0,01$	0,05	$0,37 \pm 0,02$	0,05
0,2	$0,358 \pm 0,09$	0,27	$0,31 \pm 0,04$	0,13
48				
0,05	$0,33 \pm 0,04$	0,08	$0,55 \pm 0,02$	0,04
0,1	$0,28 \pm 0,05$	0,16	$0,51 \pm 0,04$	0,11
0,2	$0,43 \pm 0,02$	0,07	$0,47 \pm 0,03$	0,09

В группе без центрифугирования через 24 часа статистически достоверное подавление роста *E. coli* по сравнению с контролем и Кл определяет-

ся только в группе с использованием 0,05% МС и длительности лазерного облучения 3 мин. ($0,36 \pm 0,01$, $p < 0,05$). Через 48 часов наблюдалась другая тенденция, то есть статистически достоверное подавление роста было в пробирках с использованием 0,05% МС при длительности лазерного облучения 3 и 5 мин., а также в пробирках, где были использованы 0,1% МС (экспозиция лазера 3 мин.) и 0,2% МС (экспозиция лазера 5 мин.) — $0,30 \pm 0,05$; $0,28 \pm 0,04$, $p < 0,05$, соответственно (табл. 5).

Таблица 5

Оптическая плотность *Escherichia coli* в присутствии метиленового синего после лазерного воздействия без центрифугирования (отн. ед.)

Концентрация метиленового синего, %	3		5	
	M ± m	δ	M ± m	δ
24 часа				
0,05	$0,36 \pm 0,01$	0,02	$0,36 \pm 0,03$	0,06
0,1	$0,39 \pm 0,01$	0,04	$0,37 \pm 0,02$	0,08
0,2	$0,34 \pm 0,04$	0,11	$0,35 \pm 0,03$	0,09
48 часов				
0,05	$0,25 \pm 0,011$	0,02	$0,37 \pm 0,02$	0,05
0,1	$0,30 \pm 0,05$	0,15	$0,50 \pm 0,03$	0,10
0,2	$0,48 \pm 0,05$	0,15	$0,28 \pm 0,04$	0,12

При сравнении результатов, полученных в разных группах, установлено, что через 24 часа максимальное, статистически достоверное подавление роста микроорганизмов наблюдалось при использовании 0,05% (вариант без центрифугирования) и 0,1% (вариант после центрифугирования) растворов МС при длительности лазерного воздействия 3 мин. Через 48 часов максимальное подавление роста микроорганизмов наблюдалось в группе без центрифугирования с использованием 0,05% МС и экспозицией лазера 3 мин. ($0,272 \pm 0,011$). Обращает на себя внимание тот факт, что наиболее оптимальной является длительность лазерного облучения 3 мин., что, по-видимому, связано с менее выраженным тепловым эффектом, чем при использовании экспозиции 5 мин. Учитывая, что МС выводится из тканей глаза через 24 часа, следует более тщательно изучить результаты, полученные в эти сроки [1]. Поскольку в случае присутствия микроорганизма в тканях глаза МС находится в межклеточном пространстве, наиболее приближенными к условиям *in vivo* мы считаем те, которые были созданы для бактерий в пробирках без центрифугирования, то есть без отделения МС от суспензии клеток. Принимая во внимание вышеизложенные условия, следует сделать вывод, что в этой ситуации достоверное подавление роста по сравнению с контролем и Кл мы наблюдали только в группе с 0,05% МС и экспозицией лазера 3 мин. Однако, проведя сравнение с группой, где определялось воздействие МС на *E. coli* без лазера, статистически достоверной эффек-

тивности МС как фотосенсибилизатора не установлено. При использовании всех концентраций МС (0,05%, 0,1% и 0,2%) статистически достоверной разницы между активированными и неактивированными растворами не обнаружено.

Полученные результаты можно объяснить тем, что грам-негативные микроорганизмы, в частности, МС плохо прокрашиваются витальными красителями. Это обусловлено особенностями строения стенки *Escherichia coli*. Эти микроорганизмы имеют сложное строение клеточной стенки, затрудняющей проникновение МС внутрь клетки. В связи с этим можно предположить, что воздействие синглетного кислорода, который вырабатывается при активации МС лазерным излучением, происходит только на уровне клеточной стенки, без повреждения клеточного ядра [6]. Оказываемого влияния синглетного кислорода недостаточно для подавления роста микроорганизмов. Для увеличения проницаемости стенки *E. coli* необходимо использовать проводники МС, что и будет изучено в последующих работах.

ВЫВОДЫ

1. При использовании метиленового синего как фотосенсибилизатора в комбинации с лазерным излучением в длинной волны 630 нм рост *Escherichia coli* подавляется незначительно.

2. Максимальное подавление роста микроорганизмов отмечается в группе без центрифугирования с использованием 0,05% МС при длительности лазерного облучения 3 минуты.

PHOTODYNAMIC EFFECT OF METHYLENE BLUE ON CULTURE OF *ESCHERICHIA COLI* IN ITS ACTIVATION BY LASER IRRADIATION

Pasyechnikova N. V., Zborovskaya A. V., Kustrin T. B.

Odessa, Ukraine

The purpose of research was to define influence combined applications of laser radiation and methylene blue (MB) as photosensitizer on pathogenic culture of *Escherichia coli* in vitro. Daily cultures were grown up in test tubes on oblique agar at 37°C. Concentration of MB was 0,2%, 0,1% and 0,05%. Activation of suspension of cells with methylene blue was by laser radiation from a long wave 630 nm during of 3 or 5 minutes. Research has shown, that growth *Escherichia coli* was not suppressed significant at use of methylene blue as photosensitizer in a combination with laser 630 nm. After 24 hours the maximal suppression of growth of microorganisms is marked in group without centrifugation with use of 0,05% MB at duration of a laser of 3 minutes. MB not penetration cells wall because it have special building, so we have used some guide, and it will be studied in the next research.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аль-Асталь Мухаммед Салих. Фотодинамическая терапия неоваскуляризации роговицы с применением метиленового синего и лазерного излучения длины волны 578 нм: Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.08 / Респуб. гос. казенное предпр. «Казахский ордена «Знак почета» научно-исследовательский институт глазных болезней». — Алматы, 2006. — 24 с.
2. Chang T. W., Fiumara N., Weinstein L. Genital herpes: Treatment with methylene blue and light exposure // *International Journal of Dermatology*. — 1975. — Vol. 14. — Issue 1. — P. 69-71.
3. Malik Z., Ladan H., Nitzan Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions // *Journal of Photochemistry and Photobiology*. — 1992. — Vol. 14, № 3. — P. 262-266.
4. Mellish K. J., Cox R. D., Vernon D. I., Griffiths J., Brown S. B. In vitro photodynamic activity of a series of methylene blue analogues // *Journal of Photochemistry and Photobiology*. — 2002. — Vol. 75. — Issue 4. — P. 392-297.
5. Nitzan Y., Gutterman M., Malik Z., Ehrenberg B. Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins // *Journal of Photochemistry and Photobiology*. — 1992. — Vol. 55, № 1. — P. 89-96.
6. Soukos N. S., Laurie Ann Ximenez-Fyvie, Michael R. Hamblin. Targeted Antimicrobial Photochemotherapy // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. — 1998. — Vol. 42, № 10. — P. 2595-2601.
7. Usacheva N. M., Teichert M. C., Biel M. A. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms // *Lasers in Surgery and Medicine*. — 2001. — Vol. 29. — Issue 2. — P. 165-173.

Поступила 1.04.2009.

Рецензент проф. Э. В. Мальцев