

**ИЗМЕНЕНИЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩИХ СВОЙСТВ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО
КОМБИНАЦИЕЙ ЕГО С 20% ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДОМ
(ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НА КУЛЬТУРУ *ESCHERICHIA COLI*)**

А. В. Зборовская, к. мед. н., Н. В. Пасечникова, д. мед. н., проф.

ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова АМН Украины»
Одесса, Украина

*Метою дослідження було визначити вплив сукупного застосування лазерного випромінювання, метиленового синього (МС) як фотосенсибілізатора та 20% диметилсульфоксиду на патогенний штам *Escherichia coli* in vitro. Концентрації МС склали 0,2%, 0,1% і 0,05%. Активацію суспензії клітин з метиленовим синім проводили з застосуванням діодного лазера з довжиною хвилі 630 нм протягом 1,5 та 3 хвилин.*

*В результаті дослідження встановлено, що ріст *Escherichia coli* трохи пригнічується при застосуванні МС як фотосенсибілізатора в комбінації з лазером. МС не проникає в глибину клітини грам-негативних мікроорганізмів, що обумовлено особливостями будови стінки *Escherichia coli*. Для збільшення проникності стінки *Escherichia coli* використовувався диметилсульфоксид як провідник. Через 24 години максимальне пригнічення росту мікроорганізмів спостерігається в групі без центрифугування з використанням 0,1% МС при тривалості лазерного опромінення 3 хвилини.*

Ключові слова: метиленовий синій, лазер, 20% диметилсульфоксид, патогенний штам *Escherichia coli*.

Ключевые слова: метиленовый синий, лазер, 20% диметилсульфоксид, патогенный штамм *Escherichia coli*.

Проблема воспалительных заболеваний глаз как причина временной нетрудоспособности (80 %) и слепоты (10 — 30 %), остается серьезнейшей в современной офтальмологии [2]. Прогностически наиболее опасными считаются кератиты, особенно бактериального генеза, часто протекающие как язва роговицы и почти всегда заканчивающиеся помутнением роговой оболочки и потерей зрения в той или иной степени [3]. Определенное место в развитии бактериальных кератитов занимает *Escherichia coli*, которая способна инфицировать переднюю поверхность глаза как непосредственно, так и через контактные линзы [6]. Не следует забывать, что *E. coli* является одним из самых частых возбудителей (около 19 %) внутрибольничных инфекций. Различные патогенные эффекты, вызываемые эшерихиями, обусловлены продуцируемыми ими энтеро-, цито- и веротоксинами, а также адгезивным и инвазивным действием самих бактерий. Исходя из имеющихся данных о патогенезе кишечных форм эшерихиозов, можно предположить, что эти микроорганизмы колонизируют плазмолемму кератоцитов и вызывают сначала деформацию апикальной цитомембраны, а затем разрушение ее выделяемым цитотоксином с последующим образованием микроэрозий и умеренно выраженным воспалительным процессом. Широкое и фактически бесконтрольное использование антибиотиков обусловило повышение резистентности бактерий к традиционной анти-

бактериальной терапии, что явилось стимулом в поисках альтернативного метода лечения локальных инфекционных процессов. Перспективной в этом смысле представляется фотодинамическая антимикробная химиотерапия [8].

Целью исследования было изучение влияния сочетанного применения водного раствора метиленового синего как фотосенсибилизатора и 20% диметилсульфоксидом как его проводника в ткани, при активации лазерным излучением с длиной волны 630 нм, на патогенный штамм *Escherichia coli* in vitro.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ. В эксперименте in vitro на культуре тканей патогенного тест-штамма *E. coli* изучался рост микроорганизмов без и под воздействием лазерного излучения длиной волны 630 нм, без и с добавлением в питательную среду: а) 20 % диметилсульфоксидом (ДМСО); б) 20 % ДМСО и раствора метиленового синего (МС) в концентрациях 0,05 %, 0,1 % и 0,2 %.

Методика проведения эксперимента аналогична описанной нами ранее [5].

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы «OpenOffice.org calc».

РЕЗУЛЬТАТЫ. В контрольных пробирках (К) рост культуры *E. coli* составил через 24 часа $0,397 \pm 0,023$ ($\delta = 0,05$) и через 48 часов $0,960 \pm 0,01$ ($\delta = 0,02$).

При изучении воздействия лазерного излучения с длиной волны 630 нм на рост культуры *E. coli* (К_л)

Таблица 2

Оптическая плотность культуры *Escherichia coli* с ДМСО 20% без и после центрифугирования (отн. ед.) с воздействием лазера

Время воздействия лазером, мин	ДМСО 20%			
	Без центрифугирования		После центрифугирования	
	M±m	δ	M±m	δ
24 часа				
1,5	0,59±0,052	0,15	0,58±0,042	0,12
3,0	0,56±0,017	0,05	0,57±0,022	0,11
48 часов				
1,5	0,68±0,05	0,14	0,66±0,039	0,11
3,0	0,48±0,232	0,66	0,55±0,178	0,50

Определение совместного влияния метиленового синего и 20 % ДМСО на *E. coli*. При сравнении оптической плотности культуры после ее инкубирования в присутствии МС в разных концентрациях и 20 % ДМСО, с результатами, зарегистрированными при инкубировании *E. coli* только с ДМСО, установлено, что через 24 часа статистически достоверное подавление роста микроорганизмов отмечается при использовании 0,1 % (в группе после центрифугирования) и 0,2 % МС (в обеих группах). При использовании 0,05 % МС разница между изменениями оптической плотности культуры статистически не достоверна. Через 48 часов статистически достоверное подавление роста микроорганизмов установлено только в группе без центрифугирования с 0,1 % МС. Во всех остальных вариантах статистически достоверной разницы не выявлено (табл. 3).

Таблица 3

Оптическая плотность культуры *Escherichia coli* в присутствии метиленового синего с ДМСО 20% (отн. ед.) без и после центрифугирования

Концентрация метиленового синего, %	Без центрифугирования		После центрифугирования	
	M±m	δ	M±m	δ
24 часа				
0,05	0,43±0,009	0,02	0,41±0,014	0,03
0,1	0,3±0,031	0,06	0,34±0,014	0,03
0,2	0,21±0,017	0,035	0,33±0,009	0,02
48 часов				
0,05	0,95±0,007	0,015	0,93±0,010	0,02
0,1	0,83±0,020	0,04	0,85±0,010	0,02
0,2	0,94±0,019	0,04	0,85±0,010	0,02

Сравнивая оптическую плотность культуры после ее инкубирования в присутствии МС в разных концентрациях и ДМСО с данными контроля, следует отметить, что через 24 часа сохраняется та же тенденция, что изложена ранее. Однако подавление роста культуры в группе с 0,1 % МС регистрируется в подгруппе без центрифугирования. Через 48 часов статистически достоверное подавление роста микробов установлено при окрашивании 0,1 % и 0,2

установлено, что через 24 часа при экспозиции лазера 1,5 мин оптическая плотность культуры составила $0,580 \pm 0,051$ ($\delta = 0,144$), при экспозиции 3 мин — $0,562 \pm 0,025$ ($\delta = 0,07$). Через 48 часов были получены следующие результаты: при длительности облучения 1,5 мин оптическая плотность культуры была $0,680 \pm 0,04$ ($\delta = 0,11$), 3 минуты — $0,573 \pm 0,015$ ($\delta = 0,41$). При этом следует подчеркнуть, что через 24 часа регистрируется статистически достоверная стимуляция роста микроорганизмов, в то время как через 48 часов — статистически достоверное подавление роста ($p < 0,05$).

При изучении влияния 20% ДМСО без облучения на рост культуры *E. coli*, установлено, что через 24 и 48 часов по сравнению с контролем (К), подавления роста микроорганизмов не наблюдалось в обеих группах (без и после центрифугирования) (табл. 1).

Таблица 1

Оптическая плотность культуры *Escherichia coli* в присутствии ДМСО 20% (отн. ед.)

Время оценки результатов	Без центрифугирования		После центрифугирования	
	M±m	δ	M±m	δ
24 часа	0,386±0,02	0,05	0,403±0,006	0,012
48 часов	0,935±0,007	0,015	0,88±0,05	0,1

При изучении свойств 20% ДМСО как фотосенсибилизатора при воздействии на культуру *E. coli*, установлено, что через 24 часа происходит стимуляция роста микроорганизмов в обеих группах (без/после центрифугирования) как по сравнению с контролем, так и по сравнению с воздействием ДМСО без лазера. При сравнении полученных данных с результатами воздействия лазера K_d не установлено статистически достоверной разницы в обеих группах при длительности лазерного облучения 1,5 и 3 минуты. Через 48 часов статистически достоверное подавление роста микробов, по сравнению с контролем, отмечалось в обеих группах (без/после центрифугирования) при длительности лазерного облучения 1,5 мин ($0,680 \pm 0,05$ и $0,660 \pm 0,04$, соответственно, $p < 0,05$). Сопоставляя оптическую плотность культуры *E. coli* после культивирования с ДМСО, активированным лазером, с результатами, полученными при простом лазерном облучении K_d и при воздействии 20% ДМСО на рост культуры, спустя 48 часов мы не получили статистически достоверной разницы между этими группами (табл. 2).

Исходя из изложенных выше данных, следует сделать вывод, что 20 % ДМСО не подавляет рост *E. coli* при фотоиндукции лазером с длиной волны 630 нм, и, таким образом, не обладает свойствами фотосенсибилизатора. Это обусловлено его химической структурой, ведь ДМСО является ограниченным сульфоксидом, и, следовательно, обладает стабильной структурой.

% МС в обеих группах (без/после центрифугирования). Во всех остальных вариантах статистически достоверных различий не выявлено.

Определение фотоиндуцированного влияния метиленового синего и 20% ДМСО на E. coli. При сравнении результатов фотоиндуцированного влияния ДМСО+МС и просто воздействия ДМСО+МС на оптическую плотность культуры, в группе после центрифугирования при всех концентрациях МС и при всех экспозициях лазера отмечается статистически достоверное снижение оптической плотности. Такая же тенденция отмечается при сравнении полученных результатов с контролем, данными K_{λ} и влиянием ДМСО и МС без лазера. Однако при оценке результатов через 48 часов, данные в группе с длительностью лазерного воздействия 3 мин незначительно отличаются от результатов K_{λ} ($p > 0,05$). Через 24 часа максимальное подавление роста микробов наблюдается в группе с использованием 0,2 % МС и экспозиции лазера 1,5 минуты. Однако статистически достоверной разницы в результатах опытов с использованием разных концентраций МС и разной длительности лазерного облучения, не было. Через 48 часов максимальное подавление роста микроорганизмов отмечено в группе с использованием 0,2 % МС и экспозиции лазера — 1,5 минуты. Но статистически достоверной разницы при испытании разных концентраций МС и разной длительности лазерного облучения не получено (табл. 4).

Таблица 4

Оптическая плотность культуры Escherichia coli в присутствии метиленового синего с ДМСО 20% после центрифугирования (отн. ед.) с воздействием лазера

Концентрация метиленового синего, %	Время действия лазера (мин)			
	1,5		3,0	
	M±m	δ	M±m	δ
24 часа				
0,05	0,19±0,052	0,15	0,12±0,031	0,09
0,1	0,13±0,050	0,14	0,13±0,019	0,05
0,2	0,09±0,030	0,08	0,16±0,053	0,15
48 часов				
0,05	0,18±0,037	0,11	0,25±0,029	0,08
0,1	0,16±0,025	0,07	0,22±0,051	0,15
0,2	0,12±0,027	0,08	0,15±0,037	0,10

В группе без центрифугирования при сравнении результатов, полученных через 24 часа, с данными всех других линий эксперимента, статистически достоверное подавление роста микробов происходило при использовании 0,1 % МС и длительности лазерного воздействия 3 минуты ($0,080 \pm 0,039$, $p < 0,05$). Через 48 часов отмечается повышение значений оптической плотности культуры, с сохранением, однако, тенденции к более низким цифрам по сравнению с влиянием ДМСО + МС без лазера ($p < 0,05$) (табл. 5).

Таблица 5

Оптическая плотность культуры Escherichia coli в присутствии метиленового синего с ДМСО 20% без центрифугирования (отн. ед.) с воздействием лазера

Концентрация метиленового синего, %	Время действия лазера (мин)			
	1,5		3,0	
	M±m	δ	M±m	δ
24 часа				
0,05	0,29±0,028	0,08	0,12±0,039	0,11
0,1	0,23±0,030	0,09	0,08±0,039	0,11
0,2	0,24±0,082	0,23	0	0
48 часов				
0,05	0,28±0,014	0,04	0,29±0,059	0,17
0,1	0,25±0,013	0,04	0,2±0,075	0,21
0,2	0,21±0,070	0,20	0,18±0,135	0,38

При сравнении результатов опытов в группах после/без центрифугирования, максимальное, статистически достоверное подавление роста E. coli установлено в группе без центрифугирования с использованием ДМСО + 0,1 % МС и экспозицией лазера 3 минуты. Однако, статистически достоверной разницы между этой группой ($0,080 \pm 0,039$) и группой ДМСО + 0,2 % МС (после центрифугирования) ($0,090 \pm 0,030$) не выявлено ($p > 0,05$).

В то же время, при сравнении результатов в разных группах, очевидно, что через 24 часа максимальное, статистически достоверное подавление роста микроорганизмов наблюдалось при использовании 0,1 % МС (вариант без центрифугирования) и длительности лазерного воздействия 3 мин. Через 48 часов максимальное подавление роста микроорганизмов наблюдалось в группе после центрифугирования с использованием 0,2 % МС и экспозицией лазера 1,5 мин. ($0,120 \pm 0,027$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ. Как известно, МС выводится из тканей глаза через 24 часа, и в условиях, когда микроорганизм находится в тканях глаза, краситель располагается в межклеточном пространстве [1]. Поэтому 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. Таким образом, в первую очередь следует учитывать те результаты, которые были получены в группе без центрифугирования через 24 часа. Опираясь на полученные данные, остается заключить, что добавление 20 % ДМСО к МС потенцирует свойства последнего как фотосенсибилизатора при воздействии на E. coli.

По-видимому, это обусловлено повышением проницаемости стенки грам-негативных микроорганизмов для МС под воздействием ДМСО. Известно, что ДМСО обладает хорошей проницаемостью через биологические мембраны, являясь проводником для многих препаратов, и повышает проницаемость разных тканей. С этой целью он и используется в медицине, в частности, в офталь-

мологии (именно в концентрации 10-20%). ДМСО является проводником разных лекарственных препаратов благодаря уникальной способности к преодолению стенок сосудов и гемато-энцефалического барьера, не повреждая биологических барьеров и мембран. Обладая антиоксидантной активностью, ДМСО играет роль специфической ловушки для гидроксильного радикала $\cdot\text{OH}$, тормозит процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ), ограничивает деструктивное действие кислорода на биомембраны (мембрано-протективный эффект). Кроме того, ДМСО обладает противовоспалительными, диуретическими, анальгезирующими, бактериостатическими и противovoотечными свойствами. Характерно, что окислительно-восстановительные реакции с участием ДМСО могут осуществляться не только в условиях *in vitro*, но и в живых организмах, в условиях *in vivo*, поскольку он в небольших количествах синтезируется в биологических системах как продукт дегидратации серосодержащих аминокислот, то есть, это соединение природного характера [7].

Таким образом, мы предполагаем, что ДМСО, потенцируя фотосенсибилизирующее действие МС на патогенную культуру *E. coli*, вероятно, может оказывать протективное воздействие на биологические структуры тканей глаза, снижая активность ПОЛ. А это будет способствовать более благоприятному течению воспалительного процесса инфекционной этиологии.

ВЫВОДЫ

Диметилсульфоксид 20 % не подавляет рост *E. coli* ни самостоятельно, ни в комбинации с лазерным излучением с длиной волны 630 нм, ни в комбинации с метиленовым синим.

При комбинации 20 % диметилсульфоксида и 0,1 % метиленового синего, с последующей фотиндукцией лазером 630 нм, отмечается максимальное подавление роста исследуемых микроорганизмов в группе без центрифугирования.

Диметилсульфоксид 20 % потенцирует фотосенсибилизирующие свойства 0,1 % метиленового синего при воздействии на *E. coli*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аль-Асталь Мухаммед Салих Фотодинамическая терапия неоваскуляризации роговицы с применением метиленового синего и лазерного излучения длины волны 578нм: Автореф. дис... к-та мед. наук: 14.00.08 / Респуб. гос. казённое предпр. «Казахский ордена «Знак почёта» научно-исследовательский институт глазных болезней». — Алматы, 2006. — 24с.
2. Майчук Ю. Ф. Глазные инфекции // Рус. Мед. Журн. — 1999. — Т.7. — № 1. — С. 16–19.
3. Майчук Ю. Ф. Новое в эпидемиологии и фармакотерапии глазных инфекций. // Клин. офтальмология. — 2000. — Т.1, №2. — С. 48–51.
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. — № 3. — 2009. — С. 60–64.
5. Пасечникова Н. В. Фотодинамическое воздействие на культуру *Escherichia coli* с использованием метиленового синего и 10 % диметилсульфоксида / Н. В. Пасечникова, А. В. Зборовская, Т. Б. Кустрин // Офтальмол. журн. — № 1. — 2010. — С. 52 — 56.
6. Сидоренко С. В. Инфекционный процесс как «диалог» между хозяином и паразитом / С. В. Сидоренко // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2001. — Т.3. — №4. — С. 301 — 315.
7. Сутковой Д. А. Диметилсульфоксид і карнозин як засоби корекції порушень про-антиоксидантного статусу в крові та мозку щурів під впливом зовнішнього рентгенівського опромінення / Д. А. Сутковой // Вестник гигиены и эпидемиологии. — 2004. — Т. 8. — № 1. — С. 144-149.
8. Ефимова Е. Г. Антимикробные эффекты фотодинамической терапии / Е. Г. Ефимова, А. А. Чейда, Е. В. Гарасько, И. В. Пругер, П. Н. Кораблин, Е. В. Кузьмина, А. О. Добролюбов // Российский биотерапевтический журнал. — 2007. — №1. — Т.6.

Поступила 17.11.2009.

Рецензент д-р мед. наук, проф. Э. В. Мальцев.

CHANGES OF PHOTOSENSITIZING PROPERTIES OF METHYLENE BLUE WITH ITS COMBINATION WITH 20% DIMEXID (AFFECTING THE CULTURE OF ESCHERICHIA COLI)

Zborovskaya A. V., Pasychnikova N. V.

Odessa, Ukraine

The purpose of the research was to determine influence of the combined application of laser radiation and methylene blue (MB) as photosensitizer and 20% dimexid on the pathogenic culture of *Escherichia coli* in vitro. The concentration of MB was 0.2%, 0.1% and 0.05%. Activation of the cell suspension with methylene blue was accomplished by the diode laser 630 nm for 1.5 and 3 min.

The research has shown that *Escherichia coli* growth was not suppressed significant by the use of methylene blue as photosensitizer in its combination with laser. Gram-negative microorganisms have a special structure of the cell wall so MB does not penetrate into the cells. We used 20% dimexid as a conductor for increase of the cell wall penetration. In 24 hours the maximal suppression of microorganism growth was marked in the group without centrifugation with the use of 0.1% MB in laser duration of 3 min.