



А.В. Зборовская

АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ И ПРОТИВОГРИБКОВОЕ ДЕЙСТВИЕ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО, АКТИВИРОВАННОГО НИЗКОИНТЕНСИВНЫМ ЛАЗЕРНЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ С ДЛИНОЙ ВОЛНЫ 630–670 НМ, НА КУЛЬТУРЫ STAPHYLOCOCCUS AUREUS, CANDIDA ALBICANS, ESCHERICHIA COLI

ГУ «Института глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМНУ», г. Одесса

Ключові слова: метиленовий синій, фотодинамічна терапія, бактерії, грибки.**Ключевые слова:** метиленовый синий, фотодинамическая терапия, бактерии, грибки.**Key words:** methylene blue, photodynamic therapy, bacteria, fungi.

Мета дослідження полягала у виявленні антибактеріальної та протигрибкової активностей метиленового синього при його активації низькоінтенсивним лазерним випромінюванням з довжиною хвилі 630–670 нм відносно до *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*. Для експерименту використовували добові культури, розведені до концентрації 2×10^4 /мл. Отриману суспензію поділено на 4 лінії експерименту з наступним висіванням на чашки Петрі: 1 лінія – контрольна, 2 – суспензію опромінювали тільки лазером, 3 – інкубували з метиленовим синім (та диметилсульфоксидом у випадку *Escherichia coli*), 4 – після інкубації з метиленовим синім (та диметилсульфоксидом у випадку *Escherichia coli*) суспензію опромінювали лазером. Чашки Петрі інкубували в термостаті протягом 24 та 48 годин з подальшим підрахунком колонієутворюючих одиниць. Встановлено, що метиленовий синій при активації лазером значно пригнічує зростання *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* і *Escherichia coli* (при поєднанні з диметилсульфоксидом), виявляючи високу антибактеріальну та протигрибкову активність.

Целью исследования было выявить антибактериальные и противогрибковые свойства метиленового синего при его активации низькоінтенсивним лазерним випромінюванням з довжиною хвилі 630–670 нм в отношении *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*. Для експеримента использовали суточные культуры, разведенные в концентрации 2×10^4 /мл. Полученную суспензию разделили на 4 линии эксперимента с последующим посевом на чашки Петри: 1 линия – контрольная, 2 – суспензию облучали только лазером, 3 – инкубировали с метиленовым синим (и диметилсульфоксидом в случае *Escherichia coli*), 4 – после инкубации с метиленовым синим (и диметилсульфоксидом в случае *Escherichia coli*) суспензию облучали лазером. Чашки Петри инкубировали в термостате в течение 24 и 48 часов с последующим подсчетом колониеобразующих единиц. Установлено, что метиленовый синий при активации лазером значительно подавляет рост *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* и *Escherichia coli* (при сочетании с диметилсульфоксидом), проявляя высокую антибактериальную и противогрибковую активность.

The purpose of investigation was to define antibacterial and antifungal properties of low intensity laser-activated methylene blue as to cultures of *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Escherichia coli*. The laser wave length was 630–670 nm. Daily cultures were diluted to concentration 2×10^4 /ml. Suspension was divided into 4 lines with further inoculation in Petri dishes: 1 – control, 2 – only laser radiation, 3 – suspension incubated with MB (and DMSO in the case of *Escherichia coli*); 4 – after incubation with MB (and DMSO in the case of *Escherichia coli*) suspension was radiated. Petri dishes were incubated for 24 and 48 hours, with further counting KFU. It was established that MB has high antibacterial and antifungal activity while be activated by laser as to *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Escherichia coli* (in combination with dimethyl sulfoxide).

В последнее десятилетие в офтальмологии активно применяется фотодинамическая терапия. Однако развитие одного из ее направлений – фотодинамической антибактериальной терапии – происходит гораздо медленнее других [1,5–8].

По данным ряда авторов, это обусловлено недостаточным объемом экспериментального материала. В наших прежних публикациях представлены результаты определения оптических плотностей культур *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* при активации метиленового синего (МС) в сочетании диметилсульфоксидом (ДМСО) низькоінтенсивним лазерним випромінюванням (НИЛИ) in vitro [2–4]. Исходя из установленных оптимальных концентраций МС – 0,1%, ДМСО – 10% и установленной длительностью облучения 3 мин, в следующей линии эксперимента решено провести исследование с высеванием суспензии клеток на чашки Петри с последующим подсчетом колониеобразующих единиц (КОЕ).

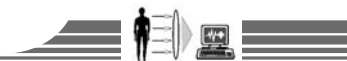
ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определить антибактериальные и противогрибковые свойства МС при его активации НИЛИ с длиной волны

630–670 нм в отношении *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Суточная культура *Staphylococcus aureus* (ATCC № 25923) разведена до концентрации 2×10^4 /мл. Полученная суспензия разделена на 4 линии. В первой, контрольной, проводили высевание суспензии клеток на чашку Петри. Во второй линии суспензию облучали НИЛИ (с помощью аппарата лазерного терапевтического «Лица-терапевт») в течение 3 минут с последующим пересевом на чашку Петри. В третьей проводили инкубацию в течение 30 минут с 0,1% раствором МС, а затем суспензию клеток пересевали на чашку Петри. В четвертой после инкубации микроорганизмов с МС в течение 30 минут проводили облучение НИЛИ мощностью 1 мВт, плотностью мощности в пятне 0,001 мВт/мкн с экспозицией 3 мин, затем пересевали на чашки Петри. Во всех чашках Петри в качестве питательной среды использовали мясо-пептонный агар, пересев производили в концентрации 4 клетки/мл. Чашки Петри инкубировали в термостате при 37°C в течение 24 и 48 часов. Количество КОЕ подсчитывали через 24 и 48

Результаты подсчета КОЕ *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*

Культура микроорганизмов	Количество КОЕ			
	Контроль	Лазер	МС	Лазер+МС
<i>Staphylococcus aureus</i>	27,13±2,58	17,25±0,62	12,38±0,63	0,88±0,35
<i>Candida albicans</i>	43,88±1,8	19,5±1,07	11,5±0,65	6,13±0,69
<i>Escherichia coli</i>	795,78±32,75	764,5±33,125	МС+ДМСО	ЛАЗЕР+МС+ДМСО
			413,5±26,5	25,5±2,25

часов. Количество параллелей эксперимента составило 4, количество повторов – 10.

Суточную культуру *Candida albicans* (АТСС 885-653) разводили до концентрации 2×10^4 /мл. Полученная суспензия разделена на 4 линии. В первой, контрольной, проводили высевание суспензии клеток на чашку Петри. Во второй суспензию облучали НИЛИ мощностью 1 мВт и плотностью мощности в пятне 0,001 мВт/мкн в течение 3 минут с последующим пересевом на чашку Петри. В третьей проводили инкубацию в течение 30 минут с 0,1% раствором МС, а затем суспензию клеток пересевали на чашку Петри. В четвертой после инкубации микроорганизмов с МС в течение 30 минут проводили облучение лазером с экспозицией 3 мин, затем пересевали на чашки Петри. Во всех чашках Петри в качестве питательной среды использовали среду Сабуро, пересев производили в концентрации 4 клетки/мл. Чашки Петри инкубировали в термостате при 37°C в течение 24 и 48 часов. Количество КОЕ подсчитывали через 24 и 48 часов. Количество параллелей эксперимента составило 4, количество повторов – 10.

Суточную культуру *Escherichia coli* (АТСС O55K5) разводили до концентрации 2×10^4 /мл. Полученная суспензия разделена на 4 линии. В первой, контрольной, проводили высевание суспензии клеток на чашку Петри. Во второй суспензию облучали НИЛИ мощностью 1 мВт и плотностью мощности в пятне 0,001 мВт/мкн в течение 3 минут с последующим пересевом на чашку Петри. В третьей проводили инкубацию в течение 30 минут с 0,1% раствором МС и 10% ДМСО, а затем суспензию клеток пересевали на чашку Петри. В четвертой после инкубации микроорганизмов с МС и 10% ДМСО в течение 30 минут проводили облучение лазером с экспозицией 3 мин, затем пересевали на чашки Петри. Во всех чашках Петри в качестве питательной среды использовали мясо-пептонный агар, пересев производили в концентрации 4 клетки/мл. Чашки Петри инкубировали в термостате при 37°C в течение 24 и 48 часов. Количество КОЕ подсчитывали через 24 и 48 часов. Количество параллелей эксперимента составило 4, количество повторов – 10.

Статистическую обработку проводили с помощью пакета программы Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Через 24 часа после посева на чашки Петри количество КОЕ *Staphylococcus aureus* в чашках с МС после лазерного

облучения было наименьшим (0,88±0,35). Максимальным количеством КОЕ было в контрольных чашках (27,13±2,58). Разница КОЕ между чашками с МС без лазера (12,38±0,63) и чашками без МС с лазерным воздействием (17,25±0,62) статистически достоверна. Также статистически достоверная разница отмечена между чашками с культурой, окрашенной МС и облученной лазером, и другими чашками ($p < 0,05$). По сравнению с контролем, снижение КОЕ в чашке с МС после лазерного облучения составило 30 раз. Через 48 часов статистически достоверного роста КОЕ не отмечено, при этом колонии приобретали признаки дегенеративных изменений (табл. 1).

Через 24 часа после посева на чашки Петри количество КОЕ *Candida albicans* в чашках с МС после лазерного облучения было наименьшим (6,13±0,69). Максимальным количеством КОЕ было в контрольных чашках (43,88±1,8). Статистически достоверная разница КОЕ между чашками с МС без лазера (11,5±0,65) и чашками без МС с лазерным воздействием (19,5±1,07) установлена ($p < 0,05$), как и между чашками с культурой, окрашенной МС и облученной лазером, и другими чашками. По сравнению с контролем, снижение КОЕ в чашке с МС после лазерного облучения составило 7,1 раза. Через 48 часов статистически достоверный рост КОЕ не отмечен (табл. 1).

Через 24 часа после посева на чашки Петри количество КОЕ *Escherichia coli* наибольшее в контрольных чашках (795,78±32,75), наименьшее – в чашках с МС и ДМСО после лазерного воздействия (25,5±2,25). В чашках без МС с лазерным воздействием статистически достоверной разницы по сравнению с контролем не отмечена (764,5±33,125). В чашках с МС и ДМСО без лазера отмечено уменьшение КОЕ лишь в 2 раза (413,5±26,5) по сравнению с контролем. По сравнению с контролем, снижение КОЕ в чашке с МС после лазерного облучения составило 24 раза. Через 48 часов статистически достоверный рост КОЕ не отмечен (табл. 1).

ВЫВОДЫ

Использование МС в комбинации с НИЛИ подавляет рост *Staphylococcus aureus* в 30 раз. Использование МС в комбинации с НИЛИ подавляет рост *Candida albicans* в 7,1 раза. Использование МС в сочетании с ДМСО в комбинации с НИЛИ подавляет рост *Escherichia coli* в 24 раза.

Установлено, что МС при его активации НИЛИ с длиной волны 630–670 нм значительно подавляет рост *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* и *Escherichia coli* (при сочета-



нии МС с ДМСО), проявляя высокую антибактериальную и противогрибковую активность.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ефимова Е.Г.* Антимикробная фотодинамическая терапия, как модель специализированной помощи больным инфицированным микроорганизмам с множественной лекарственной устойчивостью / *Е.Г. Ефимова, А.А. Чейда, Е.В. Тарасько [и др.]* // Физ. Мед. – 2006. – Т. 16, №2. – С. 58–60.
2. *Пасечникова Н.В.* Влияние фотодинамических свойств метиленового синего на культуру *Candida albicans* в условиях лазерного облучения / *Н.В. Пасечникова, А.В. Зборовская, Т.Б. Кустрин* // Офтальмологический журнал. – 2009. – №1–2. – С. 37–40.
3. *Пасечникова Н.В.* Антибактериальное действие метиленового синего, активированного лазерным излучением с длиной волны 630 нм, на культуру золотистого стафилококка / *Н.В. Пасечникова, А.В. Зборовская, Н.А. Самолук* // Офтальмологический журнал. – 2009. – №1–2. – С. 88–91.
4. *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* // Офтальмологический журнал. – 2010. – №1. – С. 59–63.
5. *Chang T.W.* In vitro activity of silver sulfadiazine against Herpesvirus hominis / *T.W. Chang, L. Weinstein* // *J. Infect. Dis.* – 1975. – Vol. 132, №1. – P. 79–81.
6. *Mellish K.J.* Verteporfin: A milestone in ophthalmology and photodynamic therapy / *K.J. Mellish, S.B. Brown* // *Exper. Opin. Pharmacother.* – 2001. – Vol. 2 – P. 351–361.
7. *Patrice T.* Photodynamic Therapy / *T. Patrice.* – Cambridge: UK, 2003. – 287 p.
8. *Usacheva M.N.* Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms / *M.N. Usacheva, M.C. Teichert, M.A. Biel* // *Lasers Surg. Med.* – 2001. – Vol. 29, №2. – P. 165–173.

Сведения об авторе:

Зборовская А.В., к. мед. н., научный сотрудник, зав. отделением воспалительных заболеваний глаза и микрохирургического лечения их последствий Института глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМНУ.

Адрес для переписки:

Зборовская Александра Владимировна. 65061, г. Одесса, Французский бульвар, 49/51.
Тел.: (048) 729 84 23.

Поступила в редакцию 05.06.2012 г.