

УДК 617.713-002.828-085.849.19-036.8

### АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО, АКТИВИРОВАННОГО ЛАЗЕРНЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ С ДЛИНОЙ ВОЛНЫ 630 НМ, НА КУЛЬТУРУ ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА

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

**Н. А. Самолук**

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

*В експериментах на добовій культурі Staphylococcus aureus вивчався вплив активованого лазерним випромінюванням розчину метиленового синього (МС) у різних концентраціях.*

*Показано, що ріст культури мікроорганізмів при використанні метиленового синього як фотосенсибілізатора в комбінації з лазерним випромінюванням (довжина хвилі — 630 нм) пригнічується.*

*Максимальне пригнічення спостерігалось в досліді з центрифугуванням через 24 години після використання 0,2% МС при експозиції лазера 3 хвилини.*

*Через 48 годин максимальне пригнічення росту культури (без центрифугування) при використанні 0,1% МС і експозиції лазерного опромінювання — 5 хвилини.*

**Ключевые слова:** Staphylococcus aureus, метиленовый синий (МС), лазер.

**Ключові слова:** Staphylococcus aureus, метиленовий синій (МС), лазер.

В последние десятилетия активно развивается фотодинамическая терапия, одним из видов которой является фотодинамическая антимикробная химиотерапия (ФАХТ) [2, 3, 4]. Фотодеструкция инфекционных агентов (ФАХТ) — это уничтожение микроорганизмов с помощью фотосенсибилизаторов при облучении светом определенной длины волны. Это альтернативный метод лечения локальных инфекционных процессов. Трудности использования ФАХТ в офтальмологии обусловлены спецификой строения органа зрения, особенностями введения и, соответственно, проникновения препаратов в полость глаза.

Целью исследования было определить эффективность антибактериального действия метиленового синего (МС), активированного лазерным излучением, на патогенный штамм Staphylococcus aureus in vitro.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Эксперименты проводились на суточной культуре патогенного тест-штамма Staphylococcus aureus (ATCC № 25923), содержащейся при температуре +4°C на поверхности скошенного мясо-пептонного агара (МПА). Выращивали культуру в пробирках на скошенном МПА при +37°C. Исходный раствор метиленового синего в дистиллированной воде имел концентрацию 0,05%, 0,1% и 0,2%.

Темновое воздействие вещества, то есть влияние МС на рост тест-штамма без лазерного облучения изучалось с использованием жидкой среды Гисса с глюкозой без индикатора Андерееде. Среду разливали в пробирки по 1 мл. Для каждого варианта концентрации метиленового синего

брали по четыре пробирки, которые стерилизовали в автоклаве при 0,5 атм. Культуру тест-микроорганизмов смывали стерильным физиологическим раствором и разводили до концентрации  $2 \times 10^4$  клеток/мл. Из полученного инокулята отбирали по 50 мкл и вносили в каждую пробирку. Конечная концентрация клеток в 1 мл среды равнялась  $1 \times 10^3$  клеток/мл.

Пробирки, содержащие культуру Staphylococcus aureus с разными концентрациями метиленового синего, инкубировали в термостате при температуре +37°C на протяжении 24 и 48 час. Об интенсивности роста тест-штамма судили по оптической плотности культуры, измерявшейся на спектрофотометре "Spekol-10" (Германия) при длине волны 540 нм. В качестве контроля служили культуры микроорганизмов, параллельно выращенные на среде Гисса без добавления МС (с концентрацией клеток  $1 \times 10^3$  клеток/мл). Оценка результатов проводилась через 24 и 48 часов после добавления МС в пробирки с культурой. Эксперимент проводился в трех повторениях для каждой концентрации метиленового синего.

*Определение фотоиндуцированного влияния метиленового синего на микроорганизмы.*

Суспензию Staphylococcus aureus готовили аналогичным способом. 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  $1 \times 10^7$  клеток/мл.

Для связывания вещества с клетками суспензию клеток с метиленовым синим инкубировали 30 мин. при комнатной температуре. Активацию исследуемого вещества проводили диодным лазером с длиной волны 630 нм в течение 3 или 5 мин. Учитывая тот факт, что спектр активации МС как фо-

© Н. В. Пасечникова, А. В. Зборовская, Н. А. Самолук, 2009.

тосенсибилизатора (т. е. его перевод в возбужденное состояние), находится в пределах 620-670 нм, выбирали длину лазерного излучения [5]. Пробирки, содержащие суспензии клеток, после облучения оставляли на 1 час при комнатной температуре, после чего разводили стерильным физиологическим раствором до концентрации  $1 \times 10^3$  клеток/мл. Из последнего разведения отбирали 50 мкл и вносили в стерильную среду Гисса с глюкозой без индикатора (вариант без центрифугирования). Параллельно исходную суспензию клеток 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). Как контроль использовали культуру микроорганизмов, полученную после облучения без исследуемого вещества для исключения влияния самого лазера на рост культуры (Кл), а также культуру, выращенную без МС и без лазера (К). Для определения воздействия только лазерного облучения на рост *Staphylococcus aureus*, пробирки с концентрацией клеток  $1 \times 10^3$  клеток/мл облучали в течение 3 и 5 минут. Количество повторов, условия инкубации и оценка результатов аналогичны вышеописанной методике. Интенсивность роста культуры по данным оптической плотности раствора оценивали через 24 и 48 часов после воздействия на пробирки лазерным облучением без последующего центрифугирования или с ним.

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 при наличии МС внутри клетки и его отсутствии в питательной среде.

В варианте без последующего центрифугирования культивирование *Staphylococcus aureus* проводилось с присутствием МС в питательной среде, однако, учитывая методику, концентрация МС была незначительной. Следует учитывать также, что МС выводится из тканей глаза через 24 часа, поэтому условия проведения эксперимента *in vitro* в определенной мере сопоставимы с условиями, в которых микроорганизмы находятся в тканях глаза, прокрашенных МС [1].

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.** В контрольных пробирках (К) рост культуры клеток через 24 часа составил  $0,268 \pm 0,032$  ( $\delta = 0,168$ ), а через 48 часов  $0,316 \pm 0,038$  ( $\delta = 0,23$ ).

При изучении влияния МС на рост *Staphylococcus aureus* без лазерного облучения статистически достоверное подавление роста микроорганизмов в группе после центрифугирования отмечено только при 0,2% МС спустя 48 часов. В остальных группах статистически достоверной разницы по сравнению с контролем не отмечено, а при 0,05% МС через 24 часа установлена статистически достоверная стимуляция роста тест-культуры (табл. 1).

В группе без проведения центрифугирования статистически достоверное подавление роста микроорганизмов наблюдалось через 24 часа при концентрациях МС 0,05% и 0,1%. При использовании 0,2% МС отмечалась стимуляция роста культуры. Через 48 часов в группе с 0,05% МС статистически

достоверной разницы с контролем не было установлено; при 0,1% МС — фиксировалось статистически достоверное подавление роста, а при концентрации МС 0,2% — стимуляция роста тест-культуры (табл. 2). Полученные результаты свидетельствуют о подавлении роста *Staphylococcus aureus* 0,1% раствором МС.

Таблица 1

Оптическая плотность культуры *Staphylococcus aureus* в присутствии метиленового синего после центрифугирования (отн. ед.)

Концентрация метиленового синего, %	M ± m	δ
24 часа		
0,05	$0,273 \pm 0,02$	0,04
0,1	$0,265 \pm 0,027$	0,07
0,2	$0,259 \pm 0,019$	0,055
48 часов		
0,05	$0,281 \pm 0,039$	0,079
0,1	$0,292 \pm 0,019$	0,078
0,2	$0,19 \pm 0,04$	0,166

Таблица 2

Оптическая плотность культуры *Staphylococcus aureus* в присутствии метиленового синего без центрифугирования (отн. ед.)

Концентрация метиленового синего, %	M ± m	δ
24 часа		
0,05	$0,242 \pm 0,008$	0,017
0,1	$0,22 \pm 0,048$	0,137
0,2	$0,282 \pm 0,02$	0,057
48 часов		
0,05	$0,235 \pm 0,088$	0,176
0,1	$0,221 \pm 0,019$	0,053
0,2	$0,553 \pm 0,03$	0,085

Таким образом, МС более эффективен в плане подавления роста *Staphylococcus aureus* в тех случаях, когда он находится и внутри клетки и во внеклеточном пространстве.

Что касается влияния лазерного излучения на рост микроорганизмов, оказалось, что через 24 часа как при длительности воздействия 3 мин., так и 5 мин. определяется стимуляция роста культуры по сравнению с контролем. Такая же тенденция наблюдается и через 48 часов, лишь при облучении в течение 5 мин. не отмечается статистически достоверной стимуляции роста *Staphylococcus aureus* (табл. 3).

Установлено, что через 24 часа после центрифугирования (табл. 4) максимальное подавление роста микроорганизмов отмечалось в пробирках, где был использован 0,2% раствор метиленового синего при длительности облучения лазером 3 мин. как по сравнению с контролем, так и по сравнению с темновой пробой. При использовании 0,2% МС

подавление роста микроорганизмов было в 4 раза больше, чем при 0,05% и 0,1% МС. В то же время через 48 часов статистически достоверной разницы между темновой пробой и контролем не отмечалось. По сравнению с Кл выраженное подавление роста тест-культуры определялось как через 24, так и через 48 часов.

Таблица 3

**Оптическая плотность культуры *Staphylococcus aureus* после лазерного воздействия (отн. ед.)**

Время лазерного облучения, мин.	M ± m	δ
24 часа		
3	0,295 ± 0,05	0,141
5	0,289 ± 0,031	0,09
48 часов		
3	0,415 ± 0,023	0,065
5	0,321 ± 0,079	0,224

Таблица 4

**Оптическая плотность культуры *Staphylococcus aureus* в присутствии метиленового синего после лазерного воздействия и центрифугирования (отн. ед.)**

Концентрация метиленового синего, %	Время воздействия лазером, мин.			
	3		5	
	M ± m	δ	M ± m	δ
24 часа				
0,05	0,078 ± 0,035	0,07	0,129 ± 0,018	0,037
0,1	0,078 ± 0,012	0,035	0,127 ± 0,071	0,201
0,2	0,018 ± 0,01	0,03	0,065 ± 0,012	0,035
48 часов				
0,05	0,119 ± 0,074	0,149	0,239 ± 0,01	0,021
0,1	0,231 ± 0,028	0,079	0,178 ± 0,02	0,056
0,2	0,086 ± 0,025	0,072	0,166 ± 0,01	0,03

При длительности лазерного воздействия 5 мин. статистически достоверное подавление роста культуры отмечалось в группах с 0,05% и 0,2% МС при оценке результатов через 24 часа (по сравнению с темновой пробой и Кл). Обращает на себя внимание тот факт, что спустя 48 часов подавление роста отмечалось лишь в группе с 0,1% МС (по сравнению с темновой пробой). По сравнению с Кл через 48 часов установлено подавление роста *Staphylococcus aureus* (табл. 4).

Без проведения центрифугирования через 24 часа максимальное подавление роста микроорганизмов отмечалось при использовании 0,05% раствора МС с облучением в течение 3 мин. Достоверной разницы в подавлении роста *Staphylococcus aureus* при экспозициях лазерного облучения 3 мин. и 5 мин. не отмечалось. В группе с использованием 0,2% МС достоверного подавления роста по сравнению с темновой пробой и Кл не было установлено, в отличие от групп с 0,05% и 0,1% МС при длительности облучения 3 и 5 мин. и оценке результатов через 24 часа (табл. 5).

Таблица 5

**Оптическая плотность культуры *Staphylococcus aureus* в присутствии метиленового синего после лазерного воздействия без центрифугирования (отн. ед.)**

Концентрация метиленового синего, %	Время воздействия лазером, мин.			
	3		5	
	M ± m	δ	M ± m	δ
24 часа				
0,05	0,042 ± 0,006	0,012	0,052 ± 0,006	0,012
0,1	0,061 ± 0,021	0,061	0,05 ± 0,025	0,07
0,2	0,167 ± 0,079	0,224	0,26 ± 0,121	0,344
48 часов				
0,05	0,089 ± 0,078	0,157	0,109 ± 0,047	0,094
0,1	0,09 ± 0,016	0,045	0,066 ± 0,028	0,079
0,2	0,105 ± 0,034	0,098	0,207 ± 0,08	0,226

Через 48 час. подавление роста микроорганизмов наблюдалось в группах с 0,1% и 0,2% МС при экспозиции лазера как 3, так и 5 мин. В группе с 0,05% МС результаты не отличались от темновой пробы и контроля. По сравнению с Кл подавление роста *Staphylococcus aureus* установлено во всех группах.

При сравнении групп с центрифугированием и без него установлено, что статистически достоверной разницы между группами с 0,05% и 0,1% МС при экспозиции 3 мин. и оценке результатов через 24 часа не установлено. В группе с 0,2% МС после центрифугирования отмечается подавление роста тест-культуры (3 мин. экспозиция лазера, через 24 часа). В то же время при длительности лазерного воздействия 5 мин. подавление роста микроорганизмов было более выраженным в группе без центрифугирования и 0,05% и 0,1% МС. А в группе с 0,2% МС более низкие цифры оптической плотности культуры отмечаются после центрифугирования.

Через 48 часов статистически достоверная разница между группами с центрифугированием и без него отмечена лишь при концентрации МС 0,1% и экспозиции лазера 3 и 5 мин. При этом подавление роста тест-культуры более выражено в группе без центрифугирования.

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что 0,1% МС подавляет рост *Staphylococcus aureus* без лазерного воздействия. В то же время лазерное облучение потенцирует способность МС подавлять рост микроорганизмов. При этом более выраженная бактерицидная активность 0,2% МС отмечается в группе после центрифугирования. Однако более стабильное подавление роста культуры *Staphylococcus aureus* наблюдалось при 0,1% МС в группе без центрифугирования, вне зависимости от длительности лазерного воздействия и времени учета результатов. Условия, подобные тем, в которых находятся микроорганизмы в группе без центрифугирования (наличие МС как в

клетке, так и вне ее), создаются и в тканях глаза при введении МС [1]. Следует отметить, что МС распределяется по тканям глаза с постепенным полным выведением из структур глаза через 24 часа.

В группе после центрифугирования при длительности лазерного воздействия 3 мин. подавление роста через 48 часов не регистрируется, а при экспозиции 5 мин. — оно происходит только в группе с 0,1% МС. Полученные результаты можно объяснить особенностями метаболизма МС в клетках *Staphylococcus aureus*.

#### ВЫВОДЫ

1. Пост *Staphylococcus aureus* подавляется при использовании метиленового синего в качестве фотосенсибилизатора в комбинации с лазерным излучением с длиной волны 630 нм.

2. Через 24 часа максимальное подавление роста микроорганизмов отмечается в пробирках после центрифугирования с использованием 0,2% МС при экспозиции лазерного облучения 3 мин.

3. Через 48 часов максимальное подавление роста микроорганизмов отмечается в пробирках без центрифугирования с использованием 0,1% при длительности лазерного облучения 5 мин.

4. Учитывая результаты, полученные в группе без центрифугирования, считаем целесообразным

использовать в качестве фотосенсибилизатора 0,1% МС.

#### 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-исследовательских институт глазных болезней». — Алматы, 2006. — 24 с.
2. **Malik Z., Hanania J., Nitzan Y.** Bactericidal effects of photoactivated porphyrins — an alternative approach to antimicrobial drugs // *Journal of Photochemistry and Photobiology*. — 1990 May. — Vol. 5, № 3-4. — P. 281-293.
3. **Wagner S. J.** Virus inactivation in blood components by photoactive phenothiazine dyes // *Transfusion Medical Review*. — 2002 Jan. — Vol. 16. — Issue 1. — P. 61-66.
4. **Wainwright Mark.** Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. — 1998. — № 42. — P. 13-28.
5. **Wainwright M., Phoenix D. A., Laycock S. L. et al.** Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* // *FEBS Microbiology Letter*. — 1998 Mar. — Vol. 160. — Issue 2. — P. 177-181.

Поступила 14.01.2009.

Рецензент проф. Э. В. Мальцев

#### ANTIBACTERIAL ACTION OF METHYLENE BLUE ACTIVATED BY LASER WITH WAVE LENGTH 630 NM ON STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Pasechnikova N. V., Zborovskaya A. V., Samoluk N. A.

Odessa, Ukraine

The purpose of investigation was to detect efficiency of antibacterial action of methylene blue (MB) activated by laser on pathogenic culture of *Staphylococcus aureus* in vitro. Daily cultures were grown up in test tubes on oblique agar at 37°C. Concentration of methylene blue (MB) was 0,2%, 0,1% and 0,05%. A number of parallels for every variant was 4, number of repeats was 3. Activation of methylene blue was made by diod laser 630 nm during 3 or 5 minutes. MB suppressed growth of *Staphylococcus aureus*. After 24 hours the maximal suppression of growth of microorganisms is marked in group without centrifugation with use of 0,2% MB in exposure of laser 3 minutes. After 48 hours the maximal suppression of growth of microorganisms was in group without centrifugation with using 0,1% MB in duration of laser radiation of 5 minutes.

