

© О.В. Зборовська, 2012

УДК 577.344.3+579.861.2+579.862.1

О.В. ЗБОРОВСЬКА

Інститут очних хвороб і тканинної терапії імені В.П. Філатова АМНУ, Одеса

ПРИГНІЧЕННЯ ЗРОСТАННЯ ГРИБКОВОЇ ФЛОРИ 0,2% МЕТИЛЕНОВИМ СИНІМ ПРИ ЛАЗЕРНОМУ ОПРОМІНЕННІ

У статті було вивчено вплив поєднаного використання 0,2% водного розчину метиленового синього (МС) як фотосенсибілізатора, і лазерного випромінювання на зростання патогенного штаму *Candida albicans* *in vitro*. Для експерименту використовували добові культури, що вирощувались у пробірках на скошеному м'ясо-пептонному агарі (МПА) при 37°C. Активацію МС в розчині здійснювали за допомогою діодного лазера з довжиною хвилі 630 нм протягом 3 або 5 хвилин. Було встановлено, що зростання *Candida albicans* пригнічується при використанні 0,2% МС як фотосенсибілізатора в комбінації з лазерним випромінюванням тільки при тривалості опромінення 3 хвилини в групі без центрифугування. Використання 0,2% МС як фотосенсибілізатора недоцільне.

Ключові слова: метиленовий синій, *Candida albicans*, лазерне опромінення, фотодинамічна терапія

Вступ. В останнє десятиріччя почала розвиватися фотодинамічна терапія, одним із видів якої є фотодинамічна антимікробна хіміотерапія (ФАХТ) [5, 6]. Фотодеструкція інфекційних агентів – це знищення мікроорганізмів за допомогою фотосенсибілізаторів при опроміненні світлом певної довжини хвилі. ФАХТ є альтернативним методом лікування локальних інфекційних процесів.

Серед багатьох існуючих фотосенсибілізаторів частіше застосовується метиленовий синій, толуїдиновий блакитний, ціаніди, акридини, рослинні фотосенсибілізатори та деякі інші, які мають властивість затримувати ріст бактерій у зв'язку з блокуванням фосфорнокислих груп нуклеопротейдів [2, 3].

На сучасному етапі, у порівнянні з іншими напрямками фотодинамічної терапії у офтальмології, ФАХТ грибкових захворювань знаходиться тільки у початковій стадії розвитку [3].

Мета дослідження. Вивчити вплив поєднаного застосування 0,2% водного розчину метиленового синього (МС) як фотосенсибілізатора лазерного випромінювання на ріст патогенного штаму *Candida albicans in vitro*.

Матеріали та методи. Експериментальне дослідження поєднаного застосування лазерного випромінювання та метиленового синього як фотосенсибілізатора проводили на культурі патогенного тест-штаму *Candida albicans*. Тест-штам зберігали на поверхні скошеного м'ясо-пептонного агару (МПА) при +4 °С. Для експерименту використовували добові культури, які вирощували у пробірках на скошеному МПА при +37 °С. Вихідний розчин досліджуваної речовини (метиленового синього) отримували у дистильованій воді. Дослідження проводили за методикою викладеною раніше [1].

При вивченні темного впливу речовини, тобто впливу МС на ріст тест-штаму без лазерного опромінення, рідке середовище Гіса з глюкозою без індикатора Андереде розливали у пробірки по 1 мл, де концентрація МС становила 0,2%. Кіль-

кість пробірок для кожного варіанта концентрації МС становила 4. Пробірки із середовищем стерилізували у автоклаві при 0,5 атм. Культуру мікроорганізмів, вирощених на скошеному МПА у пробірках, змивали стерильним фізіологічним розчином. Отриману суспензію розводили стерильним фізіологічним розчином до концентрації 2×10^4 клітин/мл. З отриманого інокуляту відбирали по 50 мкл і вносили у кожен пробірку з відповідною концентрацією метиленового синього. Таким чином, кінцева концентрація була 1×10^3 клітин/мл.

Культуру з метиленовим синім інкубували у термостаті при +37 протягом 24 і 48 год. Інтенсивність росту визначали за оптичною щільністю культури, яку вимірювали на спектрофотометрії "Spekol-10" (Німеччина) при довжині хвилі 540 нм. В якості контролю використовували культури мікроорганізмів, паралельно вирощені на середовищі Гіса без додавання МС. Оцінка результатів, тобто інтенсивності росту культури за даними оптичної щільності розчину, проводилася через 24 і 48 годин після додавання МС у пробірки з культурою.

Визначення фотоіндукованого впливу метиленового синього на мікроорганізми.

Суспензію клітин тест-мікроорганізмів готували аналогічно описаному вище. По 50 мкл отриманої суспензії вносили у пробірки з 1 мл стерильного фізіологічного розчину, що містив 0,2% метиленового синього. Таким чином, у пробірках отримували концентрацію 10^7 клітин/мл. Для зв'язування МС з клітинами суспензію клітин з метиленовим синім інкубували протягом 30 хв при кімнатній температурі.

Активацію метиленового синього в розчині здійснювали за допомогою діодного лазера з довжиною хвилі 630 нм протягом 3 або 5 хв. Опромінену суспензію залишали на 1 годину при кімнатній температурі, після чого розводили стерильним фізіологічним розчином до концентрації 10^3 клітин/мл. З останнього розведення відбирали 50 мкл і вноси-

ли в стерильне середовище Гіса з глюкозою без індикатора (варіант без центрифугування). Паралельно вихідну суспензію мікроорганізмів центрифугували 20 хв при 1200 об/хв, після чого рідину над осадом зливали і стерильним фізіологічним розчином доводили до концентрації 10^3 клітин/мл, відбираючи 50 мкл у стерильне живильне середовище (варіант з центрифугуванням). Як контроль використовували культуру мікроорганізмів, отриману після опромінення без досліджуваної речовини для виключення впливу самого лазера на ріст культури. Кількість повторів і умови інкубації аналогічні попередній методиці. Оцінка результатів, тобто інтенсивності росту культури за даними оптичної щільності розчину, проводилася через 24 і 48 годин після впливу на пробірки лазерним опромінюванням без подальшого центрифугування або з ним. Всі експерименти повторювалися 3 рази.

Результати досліджень та їх обговорення. У контрольних пробірках ріст культури клітин склав $0,127 \pm 0,016$ (δ 0,07) та $0,236 \pm 0,026$ (δ 0,09) через 24 та 48 годин відповідно. У темновій пробі, тобто визначенні впливу МС на ріст тест-штаму без лазерного опромінення, через 24 години статистично достовірно пригнічення росту зазначалося у варіанті після центрифугування в порівнянні з контролем $0,014 \pm 0,01$ (δ 0,03). У варіанті без центрифугування пригнічення росту було статистично недостовірним ($0,121 \pm 0,015$). Під час оцінки результатів через 48 годин спостерігалася стимуляція росту мікроорганізмів у групі після центрифугування $0,238 \pm 0,028$ (δ 0,07). Однак у групі без центрифугування спостерігалася пригнічення росту мікроорганізмів практично в 2 рази $0,123 \pm 0,06$ (δ 0,17), що можливо зумовлено уповільненим впливом МС на *Candida Albicans* (табл. 1).

Таблиця 1

Оптична щільність культури <i>Candida albicans</i> у присутності метиленового синього (відн.од.)				
Час оцінки результатів	Без центрифугування		Після центрифугування	
	M \pm m	δ	M \pm m	δ
24 години	$0,121 \pm 0,015$	0,044	$0,014 \pm 0,01$	0,03
48 годин	$0,123 \pm 0,06$	0,17	$0,238 \pm 0,028$	0,07

При визначенні впливу лазерного випромінювання на ріст *Candida albicans* у порівнянні з контролем через 24 години визначається стимуляція росту, особливо при тривалості опромінення 3 хв, що склало $0,300 \pm 0,016$ (δ 0,065). Через 48 годин спостерігалася продовження стимуляції росту грибків: $0,335 \pm 0,083$ (δ 0,332) при опроміненні 3 хви-

лини, і $0,310 \pm 0,052$ (δ 0,210) при 5 хвилин (табл. 2).

Стимуляцію росту грибків при лазерному впливі можна пояснити, скоріше за все, вираженими тепловими ефектами при збільшенні тривалості опромінення, що могло стимулювати ріст *Candida albicans*.

Таблиця 2

Оптична щільність культури <i>Candida albicans</i> після лазерного впливу (відн.од.)		
Час лазерного опромінення, хв	M \pm m	δ
24 години		
3	$0,30 \pm 0,016$	0,065
5	$0,209 \pm 0,018$	0,074
48 годин		
3	$0,335 \pm 0,083$	0,332
5	$0,311 \pm 0,052$	0,21

Проведені дослідження показали, що через 24 години після центрифугування з використанням метиленового синього при тривалості опромінення лазером 3 хвилини ($0,49 \pm 0,02$ (δ 0,06)) і 5 хвилин ($0,21 \pm 0,021$ (δ 0,06)) відзначалася стимуляція росту мікроорганізмів як у порівнянні з контролем, так і в порівнянні з темною пробою. Слід зазначити, що більш активна стимуляція росту грибків відбувається при експозиції лазера 3 хв (у 2 рази порівняно з 5 хв і 3,8 разу у порівнянні з контролем).

Через 48 год після центрифугування з використанням МС при тривалості опромінення лазером 3 хвилини ($0,297 \pm 0,1$ (δ 0,28)) і 5 хвилин ($0,215 \pm 0,05$ (δ 0,141)) так само спостерігалася стимуляція росту грибків. При цьому слід зазначити, що в групі з експозицією лазера 3 хв, в порівнянні із зростанням грибків через 24 години, відзначалося зниження інтенсивності росту через 48 годин.

У групі без проведення центрифугування, через 24 години максимальне пригнічення росту грибків

було при використанні метиленового синього при експозиції лазерного опромінення 3 хв, де ріст культури клітин склав $0,011 \pm 0,005$ (δ 0,026), як у порівнянні з темною пробою так і в порівнянні з контролем. При тривалості опромінення 5 хв спостерігалася стимуляція росту грибків в порівнянні з контролем $0,16 \pm 0,001$ (δ 0,031). Через 48 годин пригнічення росту мікроорганізмів було статистично достовірно при тривалості опромінення 3 та 5 хв ($0,035 \pm 0,007$ (δ 0,04) та $0,055 \pm 0,018$ (δ 0,05)) як у порівнянні з контролем, так і в порівнянні з темною пробою (табл. 3).

Беручи до уваги той факт, що МС розподіляється по тканинах ока з поступовим повним виведенням з структурока через 24 години,

слід особливо враховувати результати, отримані в групі без центрифугування через 24 години.

Таким чином, 0,2% МС не має інгібуючого впливу на ріст *Candida albicans* у темновій пробі, тобто без лазерної дії. Варто було б очікувати різкого пригнічення росту грибків при такій концентрації МС. Стимуляція росту грибків при використанні 0,2% розчину МС ймовірно відбувається через особливості так званого «доза-ефекту». Є публікації, у яких наводяться відомості про більш високу ефективність низьких концентрацій речовин, що мають антибактеріальну активність, у порівнянні з більш високими їх концентраціями [4].

Таблиця 3

Оптична щільність культури *Candida albicans*
у присутності 0,2% метиленового синього після лазерного опромінення (відн.од.)

Час оцінювання	Час опромінення лазером, хв							
	3				5			
	без центрифугування		після центрифугування		без центрифугування		після центрифугування	
	M ± m	δ	M ± m	δ	M ± m	δ	M ± m	δ
24 години	0,011 ± 0,005	0,026	0,49 ± 0,02	0,06	0,16 ± 0,001	0,031	0,21 ± 0,021	0,06
48 годин	0,035 ± 0,007	0,04	0,297 ± 0,1	0,28	0,055 ± 0,018	0,05	0,215 ± 0,05	0,141

Однак при поєднанні 0,2% МС з лазерним випромінюванням із довжиною хвилі 630 нм при тривалості опромінення 3 хв відбувається пригнічення росту грибків: у 11 разів у порівнянні з темною пробою при оцінці результатів через 24 години, і в 3,5 разу при оцінці результатів через 48 годин. Це відбувається лише в умовах (група без центрифугування), подібних до тих, у яких мікроорганізми знаходяться в тканинах ока при попаданні туди МС (коли барвник знаходиться як всередині, так і поза клітиною). Через 48 годин, після того, як барвник виводиться з міжклітинного простору (варіант без

центрифугування, 3 хв лазерного опромінення), 0,2% МС не пригнічує ріст грибків. При тривалості лазерного опромінення 5 хв пригнічення росту мікроорганізмів не відбувається.

Висновки. 1. Ріст *Candida albicans* пригнічується при використанні 0,2% метиленового синього як фотосенсибілізатора у комбінації з лазерним випромінюванням з довжиною хвилі 630 нм тільки при тривалості лазерного опромінення 3 хв у групі без центрифугування.

2. Використання 0,2% МС як фотосенсибілізатора недоцільне.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. 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.
2. Яковлев С.В. Антибиотики в лечении сепсиса / С. В. Яковлев // Инфекции и антимикробная терапия. — 2001. — Т. 3, № 3. — С. 6—7.
3. Nitzan Y. Structure-activity relationship of porphines for photoinactivation of bacteria / Y. Nitzan, R. Dror, H. Ladan [et al.] // J. Photochem. Photobiol. — 1995 (Aug). — Vol. 62 (2). — P. 342—347.
4. Roy. R. Ultradilute Ag-aquasols with extraordinary bactericidal properties: role of the system Ag-O-H₂O Hoover M.R., R. Roy, A.S Bhalla. [et al.] // Materials Research Innovations. — 2007. — Vol. 11, № 1. — P. 3—18.
5. Wainwright M. Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* / M. Wainwright, D.A. Phoenix, S.L. Laycock, D.R. Wareing, P. A. Wright // FEMS Microbiology Letter. — 1998. — Vol. 160, Issue 2. — P.177—181.
6. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) / M. Wainwright // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. — 1998. — № 42. — P.13—28.

A.V. ZBOROVSKAYA

Filatov's Institute of Ocular Disease and Tissue Therapy UMSA, Odesa

INHIBITION OF FUNGOUS FLORA GROWTH WITH 0,2% METHYLENE BLUE IN COMBINATION WITH LASER RADIATION

The purpose of research was to define influence combined applications of laser radiation and methylene blue (MB) as photosensitizer on pathogenic culture of *Candida albicans* in vitro. Daily cultures were grown up in test tubes on oblique agar at 37°C. Concentration of MB was 0,2%. Activation of MB was made by diod laser with a wave length 630 nm during 3 or 5 minutes. Research has shown, that growth of *Candida albicans* suppressed at use of 0,2% MB as photosensitizer in a combination with laser radiation with the wave length 630 nm only at an exposition of laser 3 min, and only in group without centrifugation. Thus, we made conclusion, that using of 0,2% MB as photosensitizer for *Candida albicans* is unreasonable.

Key words: methylene blue, *Candida albicans*, laser radiation, photodynamic therapy

Стаття надійшла до редакції: 10.02.2012 р.