

© О.В. Зборовська, 2011

УДК 577.344.3+579.861.2+579.862.1

О.В. ЗБОРОВСЬКА

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

## ПРИГНІЧЕННЯ ЗРОСТАННЯ ГРИБКОВОЇ ФЛОРИ 0,1% МЕТИЛЕНОВИМ СИНІМ ПРИ ЛАЗЕРНОМУ ОПРОМІНЕННІ

Метою дослідження було вивчення впливу поєданого використання 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 МПА при 37°C. Концентрація МС була 0,1%. 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* активно пригнічується при використанні 0,1% МС як фотосенсибілізатора в комбінації з лазерним випромінюванням при тривалості опромінення 3 хвилини. Максимальне пригнічення було в групі без центрифугування при тривалості опромінення 3 хвилини.

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

**Вступ.** Антимікробна фотодинамічна терапія (АФДТ) являє собою один з перспективних напрямків неонкологічного використання ФДТ. Зацікавленість у цьому напрямку зумовлена тим, що АФДТ діє за принципом природного біологічного антибактеріального захисту макроорганізму. Використання АФДТ в теперішній час є достатньо перспективним, особливо у комплексі з традиційною терапією, хірургічними методами та методами фізичного впливу на збудників інфекційних хвороб [2, 3].

**Мета дослідження.** Вивчити вплив поєданого використання 0,1% розчину метиленового синього (МС) як фотосенсибілізатора та лазерного опромінення на зростання патогенного штаму *Candida albicans in vitro*.

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

При вивченні темної дії речовини, тобто впливу МС на зростання тест-штаму без лазерного опромінення, рідке середовище Гіса з глюкозою без індикатора Андереде розливали у пробірки по 1 мл, де концентрація МС складала 0,1%. Кількість пробірок для кожного варіанту концентрації МС була 4. Пробірки із середовищем стерилізували у автоклаві при 0,5 атм. Культуру мікроорганізмів, культивованих на скошеному МПА у пробірках, змивали стерильним фізіологічним розчином. Отриману суспензію розводили стерильним фізіологічним розчином до концентрації  $2 \times 10^4$

клітин/мл. З отриманого інокуляту відбирали по 50 мкл та вносили у кожен пробірочку із відповідною концентрацією метиленового синього. Таким чином, кінцева концентрація була  $1 \times 10^3$  клітин/мл.

Культуру із метиленовим синім інкубували у термостаті при +37°C протягом 24 і 48 годин. Інтенсивність росту визначали по оптичній щільності культури, яку вимірювали на спектрофотометрі "Spekol-10" (Німеччина) при довжині хвилі 540 нм. Як контроль використовували культури мікроорганізмів, паралельно культивованих на середовищі Гіса без додавання МС. Оцінка результатів, тобто інтенсивності зростання культури за даними оптичної щільності розчину, проводилася через 24 та 48 годин після додавання МС у пробірочки з культурою.

Визначення фотоіндукованого впливу метиленового синього на мікроорганізми.

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

Активацію метиленового синього у розчині здійснювали за допомогою діодного лазера з довжиною 630 нм протягом 3 чи 5 хвилин. 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 та вносили у стерильне середовище Гіса з глюкозою без індикатора (варіант без центрифугування). Паралельно початкову суспензію мікроорганізмів центрифугували 20 хвилин 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 із центрифугуванням). Як контроль використовували культуру мікроорганізмів, отриману після опромінення без досліджуваної рідини для виключення впливу самого лазера на зростання культури. Кількість повторів та умови інкубації аналогічні попередній методиці. Оцінка результатів, тобто інтенсивності росту культури за даними оптичної щільності розчину, проводилася через 24 та 48 годин після лазерного опромінення пробірок без подальшого центрифугування або з ним. Всі експерименти проводились у 3-х повторях.

**Результати досліджень та їх обговорення.** У контрольних пробірках зростання культури клітин

склало через 24 години  $0,127 \pm 0,016$  ( $\delta$  0,07) та через 48 годин  $0,236 \pm 0,026$  ( $\delta$  0,09). В темновій пробі, тобто визначенні впливу МС на зростання тест-штаму без лазерного опромінення, через 24 години статистично достовірне пригнічення росту відзначалось у варіанті після центрифугування у порівнянні із контролем  $0,043 \pm 0,013$  ( $\delta$  0,027  $p < 0,05$ ). У варіанті без центрифугування пригнічення росту було статистично недостовірне  $0,08 \pm 0,01$  ( $\delta$  0,03). При оцінюванні результатів через 48 годин була відзначена стимуляція зростання мікроорганізмів у групі після центрифугування  $0,323 \pm 0,031$  ( $\delta$  0,089), та таке ж саме зростання як і в контрольній групі без центрифугування  $0,208 \pm 0,02$  ( $\delta$  0,07) (табл. 1).

Таблиця 1

Оптична щільність культури *Candida albicans* у присутності метиленового синього (відн.од.)

Час оцінювання результатів	Без центрифугування		Після центрифугування	
	M ± m	δ	M ± m	δ
24 години	$0,08 \pm 0,01$	0,03	$0,043 \pm 0,013$	0,027
48 годин	$0,208 \pm 0,02$	0,07	$0,323 \pm 0,031$	0,089

При визначенні впливу лазерного опромінення на зростання *Candida albicans* у порівнянні з контролем через 24 години відзначалась стимуляція росту культури особливо при тривалості опромінення 3 хвилини, що склало

$0,300 \pm 0,016$  ( $\delta$  0,065  $p < 0,05$ ). Через 48 годин відзначалось продовження стимуляції зростання грибків:  $0,335 \pm 0,083$  ( $\delta$  0,332) при опроміненні 3 хвилини, та  $0,310 \pm 0,052$  ( $\delta$  0,210) при 5 хвилинах (табл. 2).

Таблиця 2

Оптична щільність культури *Candida albicans* після лазерного опромінення (відн.од.)

Час лазерного опромінення, хв	M ± 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

Стимуляцію зростання грибків при лазерному опроміненні можна пояснити, швидкоріше за все, вираженими тепловими ефектами при збільшенні тривалості опромінення, що могло стимулювати зростання *Candida albicans*.

Визначення фотоіндукованого впливу метиленового синього на мікроорганізми (табл. 3).

Проведені дослідження показали, що через 24 години після центрифугування з використанням 0,1% водного розчину метиленового синього при тривалості опромінення лазером 3 та 5 хвилин зростання культури клітин  $0,166 \pm 0,02$  ( $\delta$  0,058) та

$0,240 \pm 0,015$  ( $\delta$  0,044) спостерігалась стимуляція росту мікроорганізмів у порівнянні із темною пробою, а також у порівнянні із контролем. Через 48 годин після центрифугування відзначалась стимуляція росту грибків у порівнянні з контролем при тривалості опромінення лазером 5 хвилин, що склало  $0,263 \pm 0,048$  ( $\delta$  0,137). У той же час при експозиції лазера 3 хвилини через 48 годин ми спостерігали статистично достовірне як у порівнянні з контролем, так і у порівнянні з темною пробою пригнічення зростання грибків  $0,036 \pm 0,06$  ( $\delta$  0,19) (у 3,5 та 9 разів відповідно).

Оптична щільність культури *Candida albicans* у присутності 0,1 % метиленового синього після лазерного опромінення (відн.од.)

Час оцінювання	Час дії лазера, 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	0,015 ±0,006	0,019	0,166 ±0,02	0,058	0,22 ±0,008	0,023	0,240 ±0,015	0,044
48 годин	0,448 ±0,021	0,05	0,036 ±0,06	0,19	0,171 ±0,056	0,15	0,263 ±0,048	0,137

У групі без проведення центрифугування, через 24 години максимальне пригнічення зростання грибків було при експозиції лазерного опромінення 3 хвилини  $0,015 \pm 0,006$  ( $\delta$  0,019), а саме у 5 разів у порівнянні з темною пробою та у 8,5 разів у порівнянні з контролем. При тривалості опромінення 5 хвилин спостерігалась стимуляція зростання грибків  $0,22 \pm 0,008$  ( $\delta$  0,023). Через 48 годин при експозиції лазера 3 та 5 хвилин відзначалась стимуляція росту мікроорганізмів, найбільш виражена при тривалості лазерного опромінення 3 хвилини ( $0,488 \pm 0,05$  у порівнянні із  $0,17 \pm 0,056$ ) (табл. 3).

Отримані результати свідчать про статистично достовірне пригнічення зростання *Candida albicans* при використанні 0,1% метиленового синього як фотосенсибілізатора у комбінації з лазерним опроміненням з довжиною хвилі 630 нм. Приймаючи до уваги той факт, що МС розподіляється по тканинах ока з поступовим повним виведенням із структур ока через 24 години, необхідно особливо приймати до уваги результати, отримані у групі без центрифугування через 24 години.

Таким чином, 0,1% МС здійснює інгібуючий вплив на зростання *Candida albicans* у темновій пробі, тобто без лазерного втручання. Проте, при поєднанні 0,1% МС з лазерним опроміненням з довжиною хвилі 630 нм при тривалості опромінення 3 хвилини

пригнічення зростання грибків прогресивно збільшується (у 5 разів у порівнянні з темною пробою та у 8,5 разів у порівнянні з контролем). Це відбувається в умовах (група без центрифугування), схожих на ті, в яких мікроорганізми знаходяться у тканинах ока при потраплянні туди МС (коли барвник знаходиться як в середині, так і поза клітиною). Через 48 годин, після того, як барвник виводиться з міжклітинного простору (варіант після центрифугування, 3 хв лазерного опромінення), 0,1% МС продовжує придушення зростання грибків. Це можливо пояснити, скоріше за все, запуском, завдяки лазерному опроміненню, ланцюгу біохімічних реакцій, які продовжують здійснюватись ще довго після припинення лазерного опромінення.

#### Висновки.

1. Зростання *Candida albicans* активно пригнічується при використанні 0,1% метиленового синього як фотосенсибілізатора у поєднанні з лазерним опроміненням з довжиною хвилі 630 нм при тривалості лазерного опромінення 3 хвилини.

2. Максимальне пригнічення зростання відзначається через 24 години у групі без центрифугування при експозиції лазера 3 хвилини.

3. В подальшому фотосенсибілізатор метиленовий синій в концентрації 0,1% буде вивчатись в експериментальних моделях на тваринах.

#### 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. 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 FUNGUS FLORA GROWTH WITH 0,1% 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 0,1%. Activation of MB was made by diode laser with a wave length 630 nm during 3 or 5 minutes. Research has shown, that growth of *Candida albicans* suppressed actively at use of MB as photosensitizer in a combination with laser radiation with the wave length 630 nm at an exposition of laser 3 min. Maximal suppression of the growth is marked in the group without centrifugation at duration of a laser 3 min.

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

**Стаття надійшла до редакції: 6.04.2011 р.**