

УДК 577.344.3+579.861.2+579.862.1

О.В. ЗБОРОВСЬКА, Т.Б. КУСТРІН., О.Е. ДОРОХОВА

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

ПРИГНІЧЕННЯ ЗРОСТАННЯ ГРИБКОВОЇ ФЛОРИ 0,05% МЕТИЛЕНОВИМ СИНІМ ПРИ ЛАЗЕРНОМУ ОПРОМІНЕННІ

Метою дослідження було вивчення впливу поєднаного 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 м'ясо-пептонному агарі (МПА) при 37°C. Концентрація МС була 0,05%. 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* при використанні 0,05% МС як фотосенсибілізатора в комбінації з лазерним випромінюванням пригнічується незначно, що свідчить про недоцільність використання 0,05% МС як фотосенсибілізатора для цього виду грибків.

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

Вступ. У зв'язку з активним розвитком фармакології розробляються все нові форми протимікробних препаратів. Проте створення більш досконаліших поколінь антибіотиків супроводжуються появою стійких до них штамів мікроорганізмів [2, 4]. В останні десятиріччя почала розвиватися фотодинамічна терапія, одним із видів якої є фотодинамічна антимікробна хіміотерапія (ФАХТ) [5, 6]. На сучасному етапі, в порівнянні з іншими напрямками фотодинамічної терапії в офтальмології, ФАХТ грибкових захворювань знаходиться лише в початковій стадії розвитку [3]. У той час грибкові кератити залишаються важливою проблемою в офтальмології, що обумовлене відсутністю ефективних протигрибкових засобів для місцевого використання.

Мета дослідження. Вивчити вплив поєднаного використання 0,05% водного розчину метиленового синього (МС) як фотосенсибілізатора і лазерного випромінювання на зростання патогенного штаму *Candida albicans* *in vitro*.

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

При вивченні темної дії речовини, тобто впливу МС на зростання тесту-штаму без лазерного опромінення, рідке середовище Гіса з глюкозою без індикатора Андереде розливали в пробірки по 1 мл, де концентрація МС складала 0,05%. Кількість пробірок було 4. Пробірки з середовищем стерилізували в автоклаві при 0,5 атм. Культуру мікроорганізмів, вирощених на скошеному МПА в пробірках, змивали стерильним фізіологічним розчином.

Отриману суспензію розводили стерильним фізіологічним розчином до концентрації 2×10^4 клітин/мл. З отриманого інокулята відбирали по 50 мкл і вносили до кожної пробірки. Таким чином, кінцева концентрація була 1×10^3 клітин/мл.

Культуру з метиленовим синім інкубували в термостаті при 37°C впродовж 24 і 48 годин. Інтенсивність зростання визначали по оптичній щільності культури, яку вимірювали на спектрофотометрі "Spekol-10" (Німеччина) при довжині хвилі 540 нм. Як контроль використовували культури мікроорганізмів, паралельно вирощені на середовищі Гіса без додавання МС. Оцінка результатів, тобто інтенсивності зростання культури за даними оптичної щільності розчину, проводилася через 24 і 48 годин після додавання МС в 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 1мл стерильного фізіологічного розчину, що містив 0,05% метиленового синього. Таким чином, в пробірках отримували концентрацію мікробних тіл 1×10^7 клітин/мл. Для зв'язування МС з клітинами суспензії кліток з метиленовим синім інкубували протягом 30 хвилин 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 1×10^3 кліток/мл. З останнього розведення відбирали 50 мкл і вносили до стерильного середовища Гіса з глюкозою без індикатора (варіант без центрифугування). Паралельно, вихідну суспензію мікроорганізмів центрифугували 20 хв при 1200об/хв, після чого рідину над осадом зливали і стерильним фізіологічним розчином доводили до концентрації 10^3 клітин/мл, відбираючи 50 мкл в стерильне живильне середовище (варіант з

центрифугованням). Як контроль використовували культуру мікроорганізмів, отриману після опромінення без досліджуваної речовини для виключення впливу самого лазера на зростання культури. Кількість повторів і умови інкубації аналогічні попередній методиці. Оцінка результатів, тобто інтенсивності зростання культури за даними оптичної щільності розчину, проводилася через 24 і 48 годин після впливу на пробірки лазерним опроміненням без подальшого центрифугування або з ним. Всі експерименти повторювалися 3 рази.

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

склало через 24 години $0,127 \pm 0,016$ (δ 0,07) і через 48 годин $0,236 \pm 0,026$ (δ 0,09). У темновій пробі, тобто визначення впливу МС на зростання тест-штаму без лазерного опромінення через 24 години, у варіанті, як без центрифугування, де зростання культури клітин склало $0,064 \pm 0,015$ (δ 0,03), так і з центрифугуванням $0,068 \pm 0,012$ (δ 0,025) спостерігалось статистично достовірне пригнічення зростання $p < 0,05$. Підчас оцінки результатів через 48 годин спостерігалася стимуляція зростання мікроорганізмів в групі після центрифугування $0,30 \pm 0,013$ (δ 0,038), і таке ж зростання як і в контролі в групі без центрифугування $0,236 \pm 0,028$ (δ 0,08) (табл. 1).

Таблиця 1

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

Час оцінки результатів	Без центрифугування		Після центрифугування	
	M ± m	δ	M ± m	δ
24 години	$0,064 \pm 0,015$	0,03	$0,068 \pm 0,012$	0,025
48 годин	$0,236 \pm 0,028$	0,08	$0,301 \pm 0,014$	0,039

При визначенні впливу лазерного опромінення на зростання *Candida albicans* в порівнянні з контролем через 24 години визначається стимуляція зростання культури особливо при тривалості опромінення 3 хвилини, що склало $0,300 \pm 0,016$ (δ

0,065) – збільшення оптичної щільності в 2,3 рази ($p < 0,05$). Через 48 годин спостерігалось продовження стимуляції зростання грибків: $0,335 \pm 0,083$ (δ 0,332) при опроміненні 3 хвилини, і $0,310 \pm 0,052$ (δ 0,210) при 5 хвилинах (табл. 2).

Таблиця 2

Оптична щільність культури *Candida albicans* після лазерного впливу (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 впливі можна пояснити, швидше за все, вираженими тепловими ефектами при збільшенні тривалості опромінення, що могло стимулювати зростання *Candida albicans*.

Визначення фотоіндукованого впливу метиленового синього на мікроорганізми.

Проведені дослідження показали, що через 24 години максимальне пригнічення зростання мікроорганізмів мало місце в групі з МС при тривалості опромінення лазером 3 хв після центрифугування, що склало $0,063 \pm 0,012$ (δ 0,035). У групі без центрифугування статистично достовірного пригнічення зростання грибків не спостерігалось при експозиції лазера 5 хв, а при лазерному опроміненні протягом 3 хв спостерігалася стимуляція

зростання мікроорганізмів при зростанні культури клітин $0,356 \pm 0,012$ (δ 0,035).

Через 48 годин в групі після центрифугування, де зростання культури клітин склало $0,236 \pm 0,056$ (δ 0,159) при тривалості опромінення 3 хвилини, в порівнянні з темною пробєю і контролем не спостерігалось статистично достовірного пригнічення зростання мікроорганізмів. Звертає на себе увагу стимуляція зростання грибків при лазерній дії протягом 5 хв, де зростання культури кліток було $0,291 \pm 0,05$ (δ 0,054) (статистично достовірна різниця з контролем). У групі без центрифугування через 48 годин спостерігалася стимуляція зростання грибків: $0,449 \pm 0,145$ (δ 0,41) при дії лазером 3 хвилини і $0,287 \pm 0,053$ (δ 0,15) при тривалості лазерної дії 5 хвилин відповідно (табл. 3).

Оптична щільність культури *Candida albicans* в присутності 0,05 % метиленового синього після лазерного опромінення (відн.од.)

Час оцінювання	Час впливу 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	0,356 ±0,012	0,035	0,063 ±0,012	0,035	0,280 ±0,018	0,051	0,322 ±0,009	0,026
48 годин	0,449 ±0,145	0,41	0,236 ±0,056	0,159	0,287 ±0,053	0,15	0,291 ±0,05	0,141

Отримані результати свідчать про статистично достовірне пригнічення зростання *Candida albicans* при використанні метиленового синього як фотосенсибілізатора в комбінації з лазерним випромінюванням з довжиною хвилі 630 нм. Проте, це спостерігається лише при експозиції лазера 3 хв і в групі після центрифугування при оцінюванні результатів через 24 години. Надалі в цих пробірках спостерігалась стимуляція зростання мікроорганізмів. При тривалості лазерного опромінення 5 хв в цій же групі без центрифугування спостерігалась стимуляція зростання грибків як через 24 так і через 48 годин.

У групі без центрифугування не відмічалось достовірного пригнічення зростання грибків, а в порівнянні з контролем відмічалась стимуляція їх зростання. Слід зазначити, що та ж тенденція спостерігається в результатах темної проби як через 24 так і через 48 годин. Зважаючи на той факт, що МС розподіляється по тканинах ока з поступовим повним виведенням із структур ока через 24 години, слід враховувати результати,

отримані в групі без центрифугування через 24 години.

Отримані результати, ймовірно, пояснюються тим, що метиленовий синій в концентрації 0,05% не володіє вираженими протигрибковими властивостями. Стимуляція зростання грибків при дії лазером (як у поєднанні з МС так і без нього) пов'язана, швидше за все з тепловими ефектами лазерного випромінювання.

Таким чином, в результаті проведеного дослідження встановлено, що МС в концентрації 0,05% викликає пригнічення зростання *Candida albicans* внаслідок реакції фотосенсибілізації лише при тривалості лазерного випромінювання 3 хв, і лише на 24 години.

Висновки. Зростання *Candida albicans* при використанні 0,05% метиленового синього як фотосенсибілізатора в комбінації з лазерним випромінюванням з довжиною хвилі 630 нм пригнічується незначно, що призводить до висновку про недоцільність використання 0,05% МС як фотосенсибілізатора для цього виду грибків.

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. Malik Z. Bactericidal effects of photoactivated porphyrins-an alternative approach to antimicrobial drugs / Malik Z., Hanania J., Nitzan Y. // J. Photochem. Photobiol. B: Biology. — 1990. — Vol. 5. — P. 281—293.
4. Stephenson J. Researchers describe latest strategies to combat antibiotic—resistant microbes / Stephenson J. // JAMA. — 2001. — Vol. 285, № 18. — P. 2318—2319.
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—81.
6. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) / M. Wainwright // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. — 1998. — № 42. — P.13—28.

Стаття надійшла до редакції 22.03.2011

A.V. ZBOROVSKAYA, MD, PHD, T.B. KUSTRIN, A.E DOROCHOVA

Filatovs institute of ocular disease and tissue therapy UMMA, Odesa

INHIBITION OF FUNGOUS FLORA GROWTH WITH 0,05% 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 0,05%. 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 insignificantly at use of 0,05% MB as photosensitizer in a combination with laser radiation. Thus, we made conclusion, that using of 0,05% MB as photosensitizer for *Candida albicans* is unreasonable.

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