

УДК 617.713-002.828-085.849.19-036.8

ВЛИЯНИЕ ФОТОДИНАМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО НА КУЛЬТУРУ CANDIDA ALBICANS В УСЛОВИЯХ ЛАЗЕРНОГО ОБЛУЧЕНИЯ

Н. В. Пасечникова, д-р мед. наук, проф.,

А. В. Зборовская, канд. мед. наук, **Т. Б. Кустрин**

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

Метою дослідження було вивчення впливу лазерного опромінення в сполученні з фотосенсибілізатором — метиленовим синім (МС) на добові культури Candida albicans. Концентрації МС дорівнювали 0,2%, 0,1% та 0,05%. Суспензію клітин з метиленовим синім активували за допомогою діодного лазера з довжиною хвилі 630 нм впродовж 3 або 5 хвилин.

Встановлено, що ріст Candida albicans при цьому пригнічується. В групі без центрифугування максимальне пригнічення росту спостерігалось через 24 години після використання 0,1% МС та трьох хвилинного опромінювання лазером.

В групі з центрифугуванням максимум пригнічення росту мікроорганізмів спостерігався через 48 годин після використання 0,05% МС і такої ж експозиції лазера.

Ключевые слова: Candida albicans, фотосенсибилизатор метиленовый синий, диодный лазер.

Ключові слова: Candida albicans, фотосенсибілізатор метиленовий синій, діодний лазер.

В связи с активным развитием фармакологии разрабатываются новые формы противомикробных препаратов. Однако создание более совершенных поколений антибиотиков сопровождается появлением устойчивых к ним штаммов микроорганизмов [2, 5]. В последние десятилетия начала развиваться фотодинамическая терапия, одним из видов которой является фотодинамическая антимикробная химиотерапия (ФАХТ) [6, 7, 8]. На современном этапе, по сравнению с другими направлениями фотодинамической терапии в офтальмологии, ФАХТ грибковых заболеваний находится только в начальной стадии развития [3]. В то же время грибковые кератиты остаются важной проблемой в офтальмологии, что обусловлено отсутствием в Украине эффективных противогрибковых средств для местного применения.

Целью исследования было изучение влияния сочетанного применения метиленового синего (МС) как фотосенсибилизатора и лазерного излучения с длиной волны 630 нм на рост патогенного штамма Candida albicans in vitro.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ. Экспериментальное исследование проводили на культуре патогенного тест-штамма Candida albicans (ATCC 885-653). Тест-штамм сохраняли на поверхности скошенного мясопептонного агара (МПА) при 4°C. Для эксперимента использовали суточные культуры, которые выращивались в пробирках на скошенном МПА при 37°C. Исходный раствор метиленового синего готовили на дистиллированной воде.

При изучении темнового воздействия вещества (тем-

новая проба), то есть влияния МС на рост тест-штамма без лазерного облучения, жидкую среду Гисса с глюкозой без индикатора Андерееде разливали в пробирки по 1 мл, где концентрация МС составляла 0,2%, 0,1% и 0,05%. Для каждого варианта концентрации МС было по 4 пробирки, которые стерилизовали в автоклаве при 0,5 атм. Культуру микроорганизмов, выращенных в пробирках на скошенном МПА, смывали стерильным физиологическим раствором. Полученную суспензию разводили стерильным физиологическим раствором до концентрации 2×10^4 клеток/мл. Из полученного инокулята отбирали по 50 мкл и вносили в каждую пробирку с соответствующей концентрацией метиленового синего. Таким образом, конечная концентрация равнялась 1×10^3 клеток/мл.

Культуру с метиленовым синим инкубировали в термостате при 37°C на протяжении 24 и 48 час. Интенсивность роста определялась по оптической плотности культуры, которую измеряли на спектрофотометре "Spekol-10" (Германия) при длине волны 540 нм. В качестве контроля использовали культуры микроорганизмов, параллельно выращенные на среде Гисса без добавления МС (с концентрацией клеток 1×10^3 клеток/мл). Оценка интенсивности роста культуры, по данным оптической плотности раствора, проводилась через 24 и 48 час после добавления МС в пробирки с культурой. Эксперимент проводился в трех повторах для каждой концентрации МС.

Определение фотоиндуцированного влияния МС на микроорганизмы.

Суспензию клеток тест-микроорганизмов готовили аналогично описанному выше. По 50 мкл полученной суспензии вносили в пробирки с 1 мл стерильного физиоло-

© Н. В. Пасечникова, А. В. Зборовская, Т. Б. Кустрин, 2009.

гического раствора, содержавшего 0,2%, 0,1% или 0,05% метиленового синего. В пробирках получали концентрацию 1×10^7 клеток/мл. Для связывания МС с клетками суспензию клеток с метиленовым синим инкубировали в течение 30 мин. при комнатной температуре.

Активацию метиленового синего в растворе осуществляли с помощью диодного лазера с длиной волны 630 нм в течение 3 или 5 минут. Выбор длины лазерного излучения был обусловлен тем, что спектр активации МС как фотосенсибилизатора (т. е. его перевод в возбужденное состояние), находится в пределах 620-670 нм [6]. Облученную суспензию оставляли на 1 час при комнатной температуре, после чего разводили стерильным физиологическим раствором до концентрации 1×10^3 клеток/мл. Из последнего разведения отбирали 50 мкл и вносили в стерильную среду Гисса с глюкозой без индикатора (вариант без центрифугирования). Параллельно исходную суспензию микроорганизмов центрифугировали 20 мин. при 1200 об./мин., после чего надосадочную жидкость сливали и стерильным физиологическим раствором доводили до концентрации 1×10^3 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 на культуру, выращенную без МС и без лазера (К). Определяя влияние лазерного излучения на рост культуры *Candida albicans*, проводили облучение пробирок с концентрацией 1×10^3 клеток/мл в течение 3 и 5 минут. Количество повторов и условия инкубации аналогичны предыдущей методике. Оценка интенсивности роста культуры, по данным оптической плотности раствора, проводилась через 24 и 48 час 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 без присутствия МС в питательной среде, однако МС находился в клетке микроорганизма.

В варианте без последующего центрифугирования культивирование грибов проводилось с присутствием МС в питательной среде, однако, при этом концентрация МС была незначительной. К тому же следует учитывать, что МС выводится из тканей глаза через 24 часа, таким образом условия проведения эксперимента *in vitro* в определенной мере сопоставимы с условиями пребывания микроорганизма в тканях глаза, прокрашенных МС [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. В контрольных пробирках рост культуры клеток через 24 часа составил $0,127 \pm 0,016$ ($\delta = 0,07$) и через 48 часов $0,236 \pm 0,026$ ($\delta = 0,09$). При определении влияния МС на рост тест-штамма без лазерного облучения, в варианте без центрифугирования, статистически достоверное подавление роста отмечалось через 24 часа при 0,05% и 0,1% МС. Однако достоверной разницы в подавлении роста грибов между этими концентрациями не отмечалось. При остальных концентрациях МС наблюдалось незначительное подавление роста грибов, как и при всех вариантах концентрации МС спустя 48 часов (табл. 1).

Таблица 1

Оптическая плотность культуры *Candida albicans* в присутствии метиленового синего после центрифугирования (отн. ед.)

Концентрация метиленового синего, %	M ± m	δ
24 часа		
0,05	$0,068 \pm 0,012$	0,025
0,1	$0,043 \pm 0,013$	0,027
0,2	$0,014 \pm 0,01$	0,03
48 часов		
0,05	$0,30 \pm 0,013$	0,038
0,1	$0,323 \pm 0,031$	0,089
0,2	$0,238 \pm 0,028$	0,07

После центрифугирования культуры статистически достоверное подавление роста фиксировалось через 24 часа при всех концентрациях МС без лазерного облучения, однако максимальным оно было при 0,2% МС. Через 48 часов наблюдалась незначительная стимуляция роста грибов (табл. 2).

Таблица 2

Оптическая плотность культуры *Candida albicans* в присутствии метиленового синего без центрифугирования (отн. ед.)

Концентрация метиленового синего, %	M ± m	δ
24 часа		
0,05	$0,064 \pm 0,015$	0,03
0,1	$0,08 \pm 0,01$	0,03
0,2	$0,121 \pm 0,015$	0,044
48 часов		
0,05	$0,236 \pm 0,028$	0,08
0,1	$0,208 \pm 0,02$	0,07
0,2	$0,123 \pm 0,06$	0,17

При определении влияния лазерного излучения на рост *Candida albicans* по сравнению с контролем через 24 часа определяется стимуляция роста, особенно при длительности облучения 3 мин. Через 48 часов наблюдалось продолжение стимуляции роста грибов (табл. 3).

Таблица 3

Оптическая плотность культуры *Candida albicans* после лазерного воздействия (отн. ед.)

Время лазерного облучения, мин.	M ± m	δ
24 часа		
3 мин.	$0,300 \pm 0,016$	0,065
5 мин.	$0,208 \pm 0,018$	0,073
48 часов		
3 мин.	$0,335 \pm 0,083$	0,332
5 мин.	$0,310 \pm 0,052$	0,210

Проведенные исследования показали, что через 24 часа после центрифугирования максимальное подавление роста микроорганизмов имело место в

Таблица 5

Оптическая плотность культуры *Candida albicans* 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	0,356 ± 0,012	0,035	0,027 ± 0,018	0,051
0,1	0,15 ± 0,006	0,0019	0,22 ± 0,008	0,023
0,2	0,011 ± 0,005	0,026	0,16 ± 0,001	0,031
48 часов				
0,05	0,449 ± 0,055	0,410	0,287 ± 0,053	0,15
0,1	0,448 ± 0,021	0,05	0,171 ± 0,056	0,15
0,2	0,035 ± 0,007	0,04	0,055 ± 0,018	0,05

Стимуляцию роста грибков при лазерном воздействии, скорее всего, можно объяснить выраженным тепловым эффектом при увеличении длительности облучения, что могло стимулировать рост *Candida albicans*.

Полученные результаты свидетельствуют о статистически достоверном подавлении роста *Candida albicans* при использовании метиленового синего как фотосенсибилизатора с активацией его лазерным излучением длиной волны 630 нм. Через 24 час. максимальное подавление роста микроорганизмов отмечается в группе без центрифугирования с использованием 0,1% МС при длительности экспозиции лазерного облучения 3 мин. По сравнению с группой после центрифугирования, а именно 0,05% МС с экспозицией лазерного излучения 3 мин., в которой отмечалось максимальное подавление роста грибков, оптическая плотность суспензии микроорганизмов снизилась в 4,2 раза.

Стимуляция роста грибков при использовании 0,1% и 0,2% растворов МС после центрифугирования вероятно, обусловлено особенностями так называемого «доза-эффекта». Есть публикации, в которых приводятся сведения о более высокой эффективности низких концентраций веществ, обладающих антибактериальной активностью, по сравнению с более высокими их концентрациями [4].

Через 48 час. максимальное статистически достоверное подавление грибков отмечалось в группе после центрифугирования с использованием 0,1% МС при экспозиции лазерного облучения 3 мин., по сравнению с темновой пробой в 9 раз, и в группе без центрифугирования при использовании 0,2% МС и длительности лазерного воздействия 5 мин. (по сравнению с темновой пробой разница статистически не достоверна). Статистически достоверной разницы между ними не было установлено. Максимальное подавление роста микроорганизмов отмечается. Принимая во внимание тот факт, что МС распределяется по тканям глаза с постепенным полным выведением из структур глаза через 24 часа

группе с использованием 0,05% раствора метиленового синего при длительности облучения лазером 3 мин. (табл. 4). Однако статистически достоверной разницы между этими данными и темновой пробой не установлено. В пробирках, где были использованы 0,1% и 0,2% растворы метиленового синего при длительности лазерного облучения 3 мин., отмечалась стимуляция роста микроорганизмов в 1,2 и 3,8 раз соответственно, по сравнению с темновой пробой. При экспозиции лазерного облучения 5 мин. увеличение роста микроорганизмов при концентрации МС 0,05% составило 2,5 раза: 0,1% — 1,8 раза, а при 0,2% — в 1,6 раза. Обращает на себя внимание тенденция уменьшения стимуляции роста грибков соответственно увеличению концентрации МС. Через 48 час. после центрифугирования также фиксировалась стимуляция роста культуры при 0,05% и 0,2% МС и длительности лазерного воздействия 3 и 5 мин. При использовании 0,1% МС отмечалось выраженное подавление роста грибков (в 9 раз по сравнению с темновой пробой).

Таблица 4

Оптическая плотность культуры *Candida albicans* в присутствии метиленового синего после лазерного воздействия после центрифугирования (отн. ед.)

Концентрация метиленового синего, %	Время воздействия лазером, мин.			
	3		5	
	M ± m	δ	M ± m	δ
24 часа				
0,05	0,063 ± 0,012	0,035	0,321 ± 0,009	0,026
0,1	0,166 ± 0,02	0,058	0,240 ± 0,015	0,044
0,2	0,49 ± 0,02	0,06	0,21 ± 0,021	0,06
48 часов				
0,05	0,263 ± 0,056	0,16	0,291 ± 0,05	0,141
0,1	0,036 ± 0,06	0,19	0,263 ± 0,048	0,137
0,2	0,297 ± 0,1	0,28	0,215 ± 0,05	0,141

В группе без проведения центрифугирования, через 24 часа подавление роста грибков было максимальным при использовании 0,1% раствора МС и экспозиции лазерного облучения 3 мин. (табл. 5). При этом в сравнении с темновой пробой подавление роста составило 5,3 раза. В пробирках с концентрацией МС 0,05% отмечалась стимуляция роста грибков, а с концентрацией 0,2% — подавление роста, однако статистически достоверной разницы с темновой пробой не отмечалось. При длительности облучения 5 мин. наблюдалась стимуляция роста грибков при использовании 0,1% и 0,2% МС, а при использовании 0,05% раствора МС статистически достоверной разницы с темновой пробой также не отмечалось. Через 48 часов подавление роста микроорганизмов было статистически достоверно в группе с использованием 0,2% раствора метиленового синего при длительности облучения 3 и 5 мин., а также в группе с 0,1% концентрацией МС при длительности облучения 5 мин.

[1], следует учитывать результаты, полученные в группе без центрифугирования через 24 часа.

Таким образом, установлено, что использование МС в концентрации 0,1% является оптимальным для максимального подавления роста грибов при использовании МС как фотосенсибилизатора. Учитывая тот факт, что в первые 24 часа на грибки, находящиеся в тканях глаза, воздействует МС, находящийся как в клетке, так и во внеклеточном пространстве, а через 48 часов только МС, находящийся внутриклеточно, через 24 часа следует учитывать данные группы без центрифугирования (подавление роста при использовании 0,1% МС и лазерном воздействии 3 мин.), а через 48 часов — данные группы после центрифугирования (подавление роста при использовании 0,1% МС и лазерном воздействии 3 мин.).

В наших последующих исследованиях намечено изучение эффективности фотосенсибилизации грибковой флоры МС в лечении грибковых кератитов.

ВЫВОДЫ

1. Рост *Candida albicans* подавляется при использовании метиленового синего как фотосенсибилизатора в комбинации с лазерным излучением в длине волны 630 нм.

2. Метиленовый синий в концентрации 0,1% при длительности лазерного облучения 3 мин. вызывает максимальное статистически достоверное подавление роста *Candida albicans*.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Аль-Асталь Муххамед 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-исследовательский институт глазных болезней». — Алматы, 2006. — 24 с.
2. **Яковлев С. В.** // Инфекции и антимикробная терапия. — 2001. — Т. 3, № 3. — С. 6-7.
4. **Malik Z., Hanania J., Nitzan Y.** Bactericidal effects of photoactivated porphyrins — an alternative approach to antimicrobial drugs // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*. — 1990. — Vol. 5. — P. 281-293.
4. **Roy R., Hoover M. R., Bhalla A. S. et al.** Ultradilute Ag-aquasols with extraordinary bactericidal properties: role of the system Ag-O-H₂O // *Materials Research Innovations*. — 2007. — Vol. 11, № 1. — P. 3-18.
5. **Stephenson J.** Researchers describe latest strategies to combat antibiotic-resistant microbes // *JAMA*. — 2001. — Vol. 285, № 18. — P. 2317-2318.
6. **Wainwright M., Phoenix D. A., Laycock S. L. et al.** Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* // *FEMS Microbiology Letters*. — 1998 Mar. — Vol. 160. — Issue 2. — P. 177-181.
7. **Wainwright Mark.** Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. — 1998. — № 42. — P. 13-28.
8. **Zeina B., Greeman J., Purcell W., Das B.** Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy // *Brit. J. Derm.* — 2001. — № 144 (2). — P. 274-278.

Поступила 23.01.2009.

Рецензент проф. Э. В. Мальцев

INFLUENCE OF PHOTODYNAMIC PROPERTIES OF METHYLENE BLUE ON THE CULTURE OF CANDIDA ALBICANS AT INFLUENCE ON IT OF LASER

Pasechnikova N. V., Zborovskaya A. V.

Odessa, Ukraine

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%, 0,1% and 0,05%. Activation of suspension of cells with methylene blue was by laser radiation from a long wave 630 nm during of 3 or 5 minutes. Research has shown, that growth *Candida albicans* suppressed at use of methylene blue as photosensitizer in a combination with laser 630 nm. After 24 hours the maximal suppression of growth of microorganisms is marked in group without centrifugation with use of 0,1% MB at duration of a laser of 3 minutes. After 48 hours the maximal suppression of growth of microorganisms is marked in group after centrifugation with use of 0,1% MB at an exposition of a laser of 3 minutes.

