



Н. В. Пасечникова,  
А. В. Зборовская,  
Л. А. Уваренко

ГУ «Институт глазных  
болезней и тканевой терапии  
имени В. П. Филатова  
АМН Украины», г. Одесса

© Н. В. Пасечникова,  
А. В. Зборовская, Л. А. Уваренко

## АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ 0,2% МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО, АКТИВИРОВАННОГО ЛАЗЕРНЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ С ДЛИНОЙ ВОЛНЫ 630 НМ, НА КУЛЬТУРУ ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА IN VITRO

**Резюме.** Целью исследования было выяснить воздействие совместного использования 0,2% водного раствора метиленового синего, активированного лазерным излучением, на патогенный штамм *Staphylococcus aureus in vitro*. Для эксперимента использовали суточные культуры, которые выращивали в пробирках на скошенном МПА при 37°C, активацию метиленового синего проводили с помощью диодного лазера с длиной волны 630 нм на протяжении 3 или 5 мин. Исследование показало, что рост *Staphylococcus aureus* подавляется при использовании метиленового синего, как фотосенсибилизатора в комбинации с лазерным излучением с длиной волны 630 нм только в группе после центрифугирования. Поэтому, дальнейшее использование 0,2% метиленового синего как фотосенсибилизатора не имеет научного значения.

**Ключевые слова:** метиленовый синий, лазер, *Staphylococcus aureus*, фотосенсибилизатор.

### Вступление

В настоящее время в результате широкого применения антибиотиков, а иногда и злоупотребления ими, возникла проблема дисбактериоза — важнейшего патогенитического фактора в активации стафилококка, сальмонелл, кишечной палочки и другой условно-патогенной флоры [3]. Главной причиной возникновения стафилококковой инфекции является нарушение механизмов естественной резистентности и патология местного иммунитета, так как в формировании аутофлоры ведущую роль играют специфические и местные иммунологические реакции организма. До 80% патогенных штаммов, выделенных от здоровых лиц, устойчивы к одному или более антибиотикам. Стафилококки, выделяемые у больных и персонала, как правило, характеризуются множественной устойчивостью, нередко к 6—8 антибиотикам. Поэтому применение антибиотиков с профилактической целью не предохраняет от гнойно-септических заболеваний, а эти препараты, являясь иммунодепрессантами и снижая защитные силы организма, способствуют колонизации госпитальных штаммов микроорганизмов, которые характеризуются не только высокой вирулентностью, но и инвазивностью. Ограничение использования антибиотиков строгими показаниями может привести к снижению антибиотикорезистентности стафилококков [4].

Целью исследования было определить влияние сочетанного применения 0,2% водного раствора метиленового синего как фотосенсибилизатора и лазерного излучения на патогенный штамм *Staphylococcus aureus in vitro*.

### Материалы и методы

Экспериментальное исследование проводили согласно методике, изложенной в наших предыдущих публикациях [2]. В исследовании применяли 0,2% водный раствор метиленового синего (МС). Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы «OpenOffice.org calc».

### Результаты исследования и их обсуждение

В контрольных пробирках (К) рост патогенного штамма *Staphylococcus aureus* через 24 ч был  $0,268 \pm 0,032$  ( $\delta = 0,168$ ), а через 48 ч —  $0,316 \pm 0,38$  ( $\delta = 0,23$ ).

При постановке темновой пробы, то есть изучения влияния МС на рост *Staphylococcus aureus* без лазерного облучения, максимальное подавление роста наблюдалось в пробирках после центрифугирования при оценке результатов через 48 ч (табл. 1). Однако статистически достоверного подавления роста культуры в обеих подгруппах (с/без центрифугирования) по сравнению с контролем не установлено ( $p > 0,05$ ). Таким образом, 0,2% МС не подавляет рост патогенного штамма *Staphylococcus aureus*.

При определении влияния лазерного излучения на рост микроорганизмов ( $K_{л}$ ) установлено, что через 24 ч при длительности лазерного воздействия как 3 мин, так и 5 мин определяется стимуляция роста культуры по сравнению с контролем. Такая же тенденция наблюдается и при оценке результатов через 48 ч, лишь при облучении в течение 5 мин не отмечается статистически достоверной стимуляции роста *Staphylococcus aureus* (табл. 2).

Оценка воздействия МС как фотосенсибилизатора. Установлено, что в подгруппе после центрифугирования при длительности лазерного облучения 3 и 5 мин наблюдается максимальное подавление роста микроорганизмов по сравнению с подгруппой без центрифугирования при оценке результатов через 24 ч (табл. 3). Разница между пробирками после центрифугирования и без него статистически не достоверна. Та же тенденция наблюдается и при сравнении результатов, полученных через 48 часов в обеих подгруппах (после/без центрифугирования, 3 и 5 мин лазерного воздействия).

По сравнению с темновой пробой, то есть определением влияния МС на рост микроорганизмов, статистически достоверная разница определяется только в группе после центрифугирования при сравнении результатов через 24 и 48 ч в обеих подгруппах (3 и 5 мин лазерного облучения).

Сравнивая полученные результаты с  $K_d$ , мы установили, что статистически достоверная разница определяется во всех подгруппах, кроме результатов, полученных в подгруппе с длительностью лазерного воздействия 5 мин через 48 ч.

Обращает на себя внимание определенная тенденция полученных результатов оптической плотности культуры *Staphylococcus aureus*. В группе

без центрифугирования через 48 ч установлено снижение плотности культуры при длительности лазерного облучения 3 мин (с  $0,167 \pm 0,079$  через 24 ч до  $0,105 \pm 0,034$ ) и 5 мин (с  $0,26 \pm 0,121$  через 24 ч до  $0,207 \pm 0,08$ ). Однако разница между результатами статистически не достоверна. В группе после центрифугирования наблюдается противоположная ситуация — рост цифр оптической плотности культуры через 48 ч при длительности лазерного облучения 3 мин (с  $0,018 \pm 0,01$  через 24 ч до  $0,086 \pm 0,025$ ) и 5 мин (с  $0,065 \pm 0,012$  через 24 ч до  $0,166 \pm 0,01$ ). При этом разница между результатами статистически достоверна. Эту тенденцию можно объяснить тем, что в пробирках, которые не подверглись центрифугированию, происходит дальнейшее воздействие МС на бактериальные клетки. МС более эффективно подавляет рост *Staphylococcus aureus* в том случае, когда он находится внутри клетки и во внеклеточном пространстве. Условия, подобные тем, в которых находятся микроорганизмы в группе без центрифугирования (наличие МС как в клетке, так и вне ее), создается и в тканях глаза при введении МС [1]. Следует принимать во внимание тот факт, что МС распределяется по тканям глаза с постепенным полным выведением из структур глаза 24 ч.

Таблица 1

Оптическая плотность культуры *Staphylococcus aureus* в присутствии 0,2% метиленового синего (отн. ед.)

Время оценки результатов	Без центрифугирования		После центрифугирования	
	$M \pm m$	$\Delta$	$M \pm m$	$\Delta$
24 ч	$0,282 \pm 0,02$	0,057	$0,259 \pm 0,019$	0,055
48 ч	$0,553 \pm 0,03$	0,085	$0,19 \pm 0,04$	0,166

Таблица 2

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

Время лазерного облучения, мин	$M \pm m$	$\Delta$
24 ч		
3	$0,295 \pm 0,05$	0,141
5	$0,289 \pm 0,031$	0,09
48 ч		
3	$0,415 \pm 0,023$	0,065
5	$0,321 \pm 0,079$	0,224

Таблица 3

Оптическая плотность культуры *Staphylococcus aureus* в присутствии 0,2% метиленового синего после лазерного воздействия (отн. ед.)

Время оценки результатов	Время воздействия лазером, мин							
	3				5			
	Без центрифугирования		После центрифугирования		Без центрифугирования		После центрифугирования	
	$M \pm m$	$\delta$	$M \pm m$	$\delta$	$M \pm m$	$\Delta$	$M \pm m$	$\delta$
24 ч	$0,167 \pm 0,079$	0,224	$0,018 \pm 0,01$	0,03	$0,26 \pm 0,121$	0,344	$0,065 \pm 0,012$	0,035
48 ч	$0,105 \pm 0,034$	0,1	$0,086 \pm 0,025$	0,072	$0,207 \pm 0,08$	0,226	$0,166 \pm 0,01$	0,03



Полученные результаты свидетельствуют о статистически достоверном подавлении роста *Staphylococcus aureus* при использовании 0,2% метиленового синего как фотосенсибилизатора в комбинации с лазерным излучением с длиной волны 630 нм. Лазерное излучение без МС стимулирует рост микроорганизмов, видимо, за счет теплового эффекта. Это подтверждается более высокими данными оптической плотности культуры (стимуляция роста микроорганизмов) при повышении длительности облучения. Однако, принимая во внимание тот факт, что метиленовый синий распределяется в тканях глаза и находится там в течение 24 ч, следует отдавать предпочтение результатам, полученным в группе пробирок без центрифугирования. Условия, которые созданы в этих пробирках, приближены к условиям, в ко-

торых находится *Staphylococcus aureus* в тканях глаза (нахождение МС в клетке и вне ее). Мы считаем целесообразным в дальнейшем изучать эффективность фотодинамической антимикробной химиотерапии с 0,2% МС в лечении поражений глаз, вызванных *Staphylococcus aureus*, принимая во внимание полученные результаты.

### Выводы

1. Рост *Staphylococcus aureus* подавляется при использовании 0,2% метиленового синего как фотосенсибилизатора в комбинации с лазерным излучением с длиной волны 630 нм только в группе после центрифугирования.

2. Однако дальнейшее исследование 0,2% метиленового синего как фотосенсибилизатора не целесообразно.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Аль-Асталь Мухаммед Салих. Фотодинамическая терапия неоваскуляризации роговицы с применением метиленового синего и лазерного излучения длины волны 578 нм: автореф. дис. на соискание науч. степени канд. мед. наук: спец. 14.00.08 «Офтальмология» / Аль-Асталь Мухаммед Салих. — Алматы, 2006. — 24 с.  
2. Пасечникова Н.В. Антибактериальное действие метиленового синего активированного лазерным излучением с длиной волны 630 нм на культуру золотистого стафилококка *in vitro* / Н.В. Пасечникова,

А.В. Зборовская, Н.А. Самолук // Офтальмологический журнал. — 2009. — № 2. — С. 88—91.

3. G. Dimopoulos. Bacterial diseases / G. Dimopoulos, I. I. Siempos, I. P. Korbila // Chest. — 2007. — Aug., 132 (2). — P. 447—55.

4. Thomas P. Principles of bacteriology, virology and immunology / Thomas P., Lodise, Andrea Kwa, Leon Cosler // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. — 2007. — Vol. 51, №11. — P. 3977—3982.

АНТИБАКТЕРІАЛЬНА  
ДІЯ 0,2% МЕТИЛЕНОВОГО  
СИНЬОГО, АКТИВОВАНОГО  
ЛАЗЕРНИМ  
ВИПРОМІНЮВАННЯМ  
ІЗ ДОВЖИНОЮ ХВИЛІ  
630 НМ, НА КУЛЬТУРУ  
ЗОЛОТИСТОГО СТАФІЛОКОКА  
IN VITRO

Н. В. Пасечникова,  
О. В. Зборовська, Л. А. Уваренко

ANTIBACTERIAL ACTION  
OF 0,2% METHYLENE BLUE  
ACTIVATED BY LASER WITH  
WAVE LENGTH 630 NM ON  
STAPHYLOCOCCUS AUREUS  
IN VITRO

N. V. Pasychnikova,  
A. V. Zborovskaya, L. A. Uvarenko

**Резюме.** Метою дослідження було виявити вплив сумісного використання 0,2% водного розчину метиленового синього, активованого лазерним випромінюванням, на патогенний штам *Staphylococcus aureus in vitro*. Для експерименту використовувалися добові культури, котрі вирощувалися у пробірках на скошеному МПА при 37°C, активацію метиленового синього виконували за допомогою діодного лазера з довжиною хвилі 630 нм протягом 3 або 5 хв. Дослідження виявило, що зростання *Staphylococcus aureus* пригнічується при використанні метиленового синього як фотосенсибілізатора у комбінації з лазерним випромінюванням із довжиною хвилі 630 нм тільки у групі після центрифугування. Тому подальше використання 0,2% метиленового синього як фотосенсибілізатора не має наукового значення.

**Ключові слова:** 0,2% метиленовий синій, *Staphylococcus aureus*, фотосенсибілізатор.

**Summary.** The purpose of investigation was to detect efficiency of antibacterial action of 0,2% 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. Activation of methylene blue was made by diod laser 630 nm during 3 or 5 minutes. The maximal suppression of the growth of microorganisms is marked only in group with centrifugation. So it is not useful to go on this investigation of antibacterial action of 0,2% methylene blue.

**Key words:** 0,2% methylene blue, laser, *Staphylococcus aureus*, photosensitizer.