



УДК 619:636,22/28

**А.В. ПАВЛОВ**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,  
**Е.Ю. СМЕРТИНА**, доктор ветеринарных наук, заведующая лабораторией,  
**Ю.Г. ЮШКОВ**, доктор сельскохозяйственных наук, заместитель директора

*Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока*  
e-mail: arginin@mail.ru

### **АНТИМИКРОБНОЕ ДЕЙСТВИЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО НА *PARAMESCIUM CAUDATUM***

Изучено воздействие фотосенсибилизатора метиленового синего в концентрациях 0,02; 0,1 и 1,0 % и временем экспозиции оптического излучения 15 мин на простейших *Paramecium caudatum*. В первом опыте к взвеси парameций добавляли равное количество раствора метиленового синего красителя с указанными концентрациями, облучение не проводили, оценивали подвижность парameций и время до их гибели. Установлено, что в растворах с концентрациями фотосенсибилизатора 0,02; 0,1 и 1,0 % время выживания парameций составило 15, 10 и 3 мин соответственно. В контроле (без воздействия) подвижность парameций не изменялась. Во втором опыте облучали парameций в течение 15 мин. В контрольной группе облучение проводили без фотосенсибилизатора. В растворах с фотосенсибилизатором время выживания парameций составило 5, 2 и 1 мин соответственно. В контрольной группе подвижность парameций не изменялась. Выявлено, что воздействие оптическим излучением на раствор фотосенсибилизатора ускоряет гибель парameций в 2–5 раз, а величина антимикробного действия прямо пропорциональна концентрации раствора и времени экспозиции оптического излучения. Метод перспективен в терапии инфекционных заболеваний, обусловленных антибиотикорезистентными микроорганизмами.

**Ключевые слова:** антибиотикорезистентность, фотодинамическая терапия, метиленовый синий краситель, парameции, оптическое излучение, деструкция клеток.

Распространение среди патогенных микроорганизмов множественной устойчивости к антибиотикам форсирует исследования в области новых методов лечения инфекционных заболеваний. Один из таких методов – фотодинамическая терапия, основанная на применении светочувствительных веществ (фотосенсибилизаторов) и оптического излучения. Действие фотосенсибилизаторов на микроорганизмы впервые обнаружил немецкий медик Oscar Raab. В 1900 г. он представил доклад и опубликовал результаты своих экспериментов в области фототоксикологии [1], которые были успешно опробованы в терапии больных карциномой кожи, сифилисом и туберкулезом [2]. Эффективность данного метода оказалась достаточно высокой, и он получил название “фотодинамический” [3]. Вскоре в связи с открытием антибиотиков исследования в этой области были приостановлены.

Механизм действия фотодинамической терапии может быть представлен как комбинированное взаимодействие трех компонентов: фотосенсибилизатора, соответствующего ему оптического излучения видимого спектра и молекулярного кислорода [4, 5]. При облучении молекулам кислорода сообщается дополнительная энергия, что сопровождается их диссоциа-

цией и образованием радикалов – супероксидного и синглетного кислорода [6]. Селективно в пораженных клетках они вызывают цитотоксические и цитостатические процессы, клетки здоровых тканей остаются неповрежденными, так как не накапливают фотосенсибилизаторы [7–9]. Это явление, по нашему мнению, может быть использовано в терапии инфекционных заболеваний, особенно имеющих локальный характер. Имеются отдельные работы по эффективной терапии таких заболеваний, например, кандидоза полости рта, вызванного антибиотикорезистентным штаммом *Candida albicans*, в ходе которой применяли в качестве фотосенсибилизатора метиленовый синий краситель и кадмий-галлий-фосфидный лазер с длиной волны 620 нм и экспозицией 5 мин [10–13]. Также показано подавление роста *Staphylococcus aureus* в результате воздействия метиленового синего красителя с последующим облучением LED-источником с длиной волны 620 нм [14–16]. Использование данного красителя объясняется его доступностью и широким распространением в лабораторной практике, поэтому представляет определенный интерес поиск наиболее эффективного сочетания концентрации красителя и времени его облучения.

Цель работы – изучить изменение антимикробного действия раствора фотосенсибилизатора с разной концентрацией и временем его облучения на *Paramecium caudatum*.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Проведены два опыта: в первом – планировали изучить выживание парамеций в растворе метиленового синего красителя с разной концентрацией, во втором – выживание парамеций в этих растворах после проведения облучения.

Объектом исследований выбраны парамеции, так как они являются стандартным тест-объектом для определения токсичности. Подвижность парамеций определяли согласно ГОСТ Р 52337–2005 “Корма, комбикорма, комбикормовое сырье, методы определения общей токсичности” в нашей модификации: подвижность парамеций условно оценивали в баллах от 5 до 1, высокоподвижные – 5, погибшие – 1.

В работе использовали растворы метиленового синего красителя в дистиллированной воде с концентрацией 0,02; 0,1 и 1,0 %, имеющие спектр поглощения оптического излучения в диапазоне 618–668 нм, а также специально разработанный LED-излучатель с длиной волны 620 нм и выходной мощностью 3500 мВт.

Первый опыт: действие метиленового синего на парамеции без облучения. В опытной группе на предметное стекло помещали взвесь парамеций в количестве 0,2 мл, к ней добавляли 0,2 мл раствора метиленового синего в концентрациях 0,02; 0,1 и 1 % и оценивали их подвижность при  $\times 100$  и  $\times 400$ . В контрольной группе раствор метиленового синего не добавляли. Время наблюдения составляло 1, 2, 3, 5, 10, 15 мин с начала опыта.

Второй опыт: действие метиленового синего на парамеции с облучением. Опыт проводили аналогично, но с облучением парамеций в течение 15 мин. Контрольную группу облучали без фотосенсибилизатора. Опыты проведены в пяти повторениях для последующей статистической обработки по Фишеру в программе MS Excel 2003.

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Результаты первого опыта представлены в табл. 1.

В опытной группе с концентрацией раствора 0,02 % подвижность парameций относительно контроля снизилась – от 4,8 % через 1 мин до 76,2 % через 15 мин; с концентрацией 0,1 % – на 9,52 и 76,2 % через 1 и 15 мин соответственно; в 1%-м растворе – на 28,5; 42,8 и 76,2 % через 1, 2 мин и более соответственно (данные достоверны). В контрольной группе подвижность парameций не изменялась.

Результаты второго опыта представлены в табл. 2.

В опытной группе с концентрацией раствора 0,02 % подвижность парameций снижалась интенсивнее – на 26,3; 52,6 и 76,2 % через 1, 3 мин и далее соответственно. В растворе с концентрацией 0,1 %: через 1 мин – на 37,5 %, через 2 мин и более – на 76,2 %. В 1%-м растворе в течение первой минуты подвижность парameций снизилась на 76,2 %, после чего они погибли (данные достоверны). В контрольной группе подвижность парameций не изменялась.

Таким образом, в первом опыте гибель парameций наступила в растворе с концентрацией 0,02 % через 15 мин, 0,1 % через 10, 1 % через 3 мин.

Во втором опыте гибель парameций наступила в растворе с концентрацией 0,02 % через 5 мин, 0,1 % через 2, 1 % через 1 мин. Гибель парameций сопровождалась изменением формы клетки на шарообразную с последующей деструкцией клеточной стенки. В контрольных группах парameции выжили. Из приведенных данных следует, что антимикробные свойства метиленового синего красителя прямо пропорциональны его концентрации и времени облучения.

Таблица 1

**Изменение подвижности парameций в растворе метиленового синего без облучения**

Время экспозиции, мин	Концентрация раствора, %						Контроль
	0,02		0,1		1		
	Среднее значение	Разница с контролем, %	Среднее значение	Разница с контролем, %	Среднее значение	Разница с контролем, %	
0	4,2 ± 0,2		4,2 ± 0,2		4,2 ± 0,2		4,4 ± 0,2
1	4 ± 0	-4,8	3,8 ± 0,2	-9,52	3 ± 0	-28,5**	4 ± 0
2	4 ± 0	-4,8	3,4 ± 0,2	-19,05*	2,4 ± 0,2	-42,8***	4 ± 0
3	3,2 ± 0,3	-23,8	2,8 ± 0,3	-33,33*	1 ± 0	-76,2*	4 ± 0
5	2,6 ± 0,2	-39,1**	1,2 ± 0,2	-71,42*	1 ± 0	-76,2*	4 ± 0
10	1,4 ± 0,2	-66,7*	1 ± 0	-76,2*	1 ± 0	-76,2*	4 ± 0
15	1 ± 0	-76,2*	1 ± 0	-76,2*	1 ± 0	-76,2*	4 ± 0

\*  $p < 0,05$ .  
 \*\*  $p < 0,01$ .  
 \*\*\*  $p < 0,001$ .

Таблица 2

## Изменение подвижности парameций в растворе метиленового синего с облучением

Время экспозиции, мин	Концентрация раствора, %						Контроль
	0,02		0,1		1		
	Среднее значение	Разница с контролем, %	Среднее значение	Разница с контролем, %	Среднее значение	Разница с контролем, %	
0	3,8 ± 0,2		3,2 ± 0,2		2,2 ± 0,2		4,4 ± 0,2
1	2,8 ± 0,2	-26,3**	2 ± 0	-37,5**	1 ± 0	-76,2*	4 ± 0
2	2,8 ± 0,2	-26,3**	1 ± 0	-76,2*	1 ± 0	-76,2*	4 ± 0
3	1,8 ± 0,2	-52,6***	1 ± 0	-76,2*	1 ± 0	-76,2*	4 ± 0
5	1 ± 0	-76,2*	1 ± 0	-76,2*	1 ± 0	-76,2*	4 ± 0
10	1 ± 0	-76,2*	1 ± 0	-76,2*	1 ± 0	-76,2*	4 ± 0
15	1 ± 0	-76,2*	1 ± 0	-76,2*	1 ± 0	-76,2*	4 ± 0

\* $p < 0,05$ .\*\* $p < 0,01$ .\*\*\* $p < 0,001$ .

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что метиленовый синий краситель в качестве фотосенсибилизатора – перспективный препарат с выраженными антимикробными свойствами, величина которых зависит от времени экспозиции излучения. Наиболее эффективным является 1%-й водный раствор, время воздействия не менее 15 мин.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Von Tappeiner H. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O. Raab // Munch. Med. Wochenschr. – 1900. – N 1. – S. 5–7.
2. Von Tappeiner H., Jesionek A. Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen // Munch. Med. Wochenschr. – 1903. – N 47. – S. 2042–2044.
3. Von Tappeiner H., Jodlbauer A. Über die Wirkung der photodynamischen Stoffe auf Protozoen und Enzyme // Dtsch. Arch. Klein. Med. – 1904. – N 80. – S. 427–487.
4. Detty M.R., Gibson S.L., Wagner S.J. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy // J. of Medicinal Chemistry. – 2004. – Vol. 47 (16). – P. 3897–3915.
5. Hamblin M., Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infection disease? // Photochem. Photobiol. – 2004. – Vol. 3(5). – P. 436–450.
6. Mantareva V., Kussovski V., Angelov I. et al. Photodynamic activity of water-soluble phthalocyanine zinc(II) complexes against pathogenic microorganisms // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2007. – Vol. 15 (14). – P. 4829–4835.
7. Pupo Y.M., Gomes G.M., Santos E.B. et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy using methylene blue and toluidine blue as photosensitizing dyes // Acta Odontol Latinoam. – 2011. – Vol. 24 (2). – P. 188–192.
8. Pariser D.M., Lowe N.J., Stewart D.M. et al. Photodynamic therapy with topical methyl aminolevulinate for actinic keratosis: results of a prospective randomized multicenter trial // J. Am. Acad. Dermatol. – 2003. – N 48. – P. 227–232.
9. Karu T.I. Effect of Visible Radiation on Cultured Cells // Photochem. Photobiol. – 1990. – Vol. 52 (6). – P. 1089–1098.
10. Pupo Y.M., Gomes G.M., Santos E.B. et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy using methylene blue and toluidine blue as photosensitizing dyes // Acta Odontol Latinoam. – 2011. – Vol. 24 (2). – P. 188–192.

11. **Конопка К., Goslinski T.** Photodynamic therapy in dentistry // J. Dent. Res. – 2007. – Vol. 86 (8). – P. 694–707.
12. **Teichert M.C., Jones J.W., Usacheva M.N., Biel M.A.** Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model // Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. – 2002. – Vol. 93. – P. 155–160.
13. **Ewerton G.D.M, Pavarina A.C., Dovigo, L.N. et al.** Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis // Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. – 2010. – Vol. 109(3). – P. 392–401.
14. **Павлов А.В., Смертина Е.Ю., Донченко Н.А.** Антимикробное действие фотосенсибилизатора метиленового синего на культуру *Staphylococcus aureus* // Сиб. вестн. с.-х. науки. – 2013. – № 3. – С. 91–94.
15. **Jori G., Fabris C., Soncin M. et al.** Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications // Las. in Surg. & Med. – 2006. – Vol. (6). – P. 468–481.
16. **Di Poto A., Sbarra S.M, Provenza G. et al.** The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defence mechanisms on *Staphylococcus aureus* biofilms // Biomaterials. – 2009. – Vol. 30. – P. 3158–3166.

Поступила в редакцию 26.09.2014

**A.V. PAVLOV, Candidate of Science in Biology, Senior Researcher,  
E.YU. SMERTINA, Doctor of Science in Veterinary Medicine, Laboratory Head,  
YU.G. YUSHKOV, Doctor of Science in Agriculture, Deputy Director**

*Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East*  
e-mail: arginin@mail.ru

#### **ANTIMICROBIAL ACTION OF PHOTSENSITIZER METHYLENE BLUE ON PARAMECIUM CAUDATUM**

There was studied the action of photosensitizer methylene blue in concentrations of 0.02, 0.1, and 1.0%, and exposure time of optical radiation of 15 minutes on the protozoa *Paramecium caudatum*. A light-emitting diode with output power of 3500 milliwatts and wavelength of 620 nanometers was used as a light source. In the first experiment, methylene blue dye solution in the concentrations stated above was added to paramecium suspension in the same proportion; optical irradiation was not performed; mobility of paramecia and time to death were evaluated. It was found that survival times of paramecia made up 15, 10, and 3 minutes as influenced by photosensitizer solutions in concentrations of 0.02, 0.1, and 1.0%, respectively. In the control group, mobility of paramecia did not change. In the second experiment, paramecia were irradiated for 15 minutes. The control group of paramecia was irradiated without photosensitizer. Survival times of paramecia in the second experiment made up 5, 2, and 1 minutes in solutions with photosensitizer concentrations of 0.02, 0.1, and 1.0%, respectively. Mobility of paramecia of the control group did not change. It has been found that the impact of optical radiation on the photosensitizer solution 2–5 times accelerates the death of paramecia, and the magnitude of the antimicrobial action is in direct proportion to the solution concentration and exposure time of optical radiation. This method is promising for the treatment of infectious diseases caused by antibiotic-resistant microorganisms.

**Keywords:** antibiotic resistance, photodynamic therapy, methylene blue dye, paramecia, optical radiation, cell destruction.