

ФОТОІНАКТИВАЦІЯ *IN VITRO* *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ЧЕРВОНИМ СВІТЛОМ (660 НМ) У ПРИСУТНОСТІ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЬОГО

П.А. Вірич

канд. біол. наук, мол. наук. співроб.

хімічний факультет

Київський національний університет ім. Т. Шевченка

вул. Льва Толстого, 12, Київ, 03033, Україна

тел.: +38 (063) 117-21-37

e-mail: sphaenodon@ukr.net

ORCID 0000-0002-1463-1992

П.А. Вірич

провідний інженер

ДУ «Інститут отоларингології

ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України»

вул. Зоологічна, 3, Київ, 03680, Україна

тел.: +38 (063) 117-21-37

e-mail: annelida@ukr.net

ORCID 0000-0001-6201-3892

В.М. Крися

д-р мед. наук, проф.

кафедра медицини катастроф та військової медицини

Івано-Франківський національний медичний

університет МОЗ України

вул. Галицька, 2, Івано-Франківськ, 76018, Україна

тел.: +38 (066) 152-59-07

e-mail: kwmt5@ukr.net

ORCID 0000-0003-3697-3157

В.С. Мартинюк

д-р біол. наук, проф.

Київський національний університет ім. Т. Шевченка

ННЦ «Інститут біології та медицини»

пр. Глушкова, 2, Київ, 03022, Україна

тел.: +38 (050) 653-55-92

e-mail: mavispublisher@gmail.com

ORCID 0000-0002-5311-3565

О.М. Надтока

канд. хім. наук, ст. наук. співроб.

хімічний факультет

Київський національний університет ім. Т. Шевченка

вул. Льва Толстого, 12, Київ, 03033, Україна

тел.: +38 (067) 292-07-60

e-mail: oksananadtoka@ukr.net

ORCID 0000-0003-1868-3885

Н.В. Куцевол

д-р хім. наук, провідний наук. співроб.

хімічний факультет

Київський національний університет ім. Т. Шевченка

вул. Льва Толстого, 12, Київ, 03033, Україна

тел.: +38 (050) 384-25-46

e-mail: kutsevol@ukr.net

ORCID 0000-0002-1468-4111

Б.В. Крися

асистент

кафедра хірургії № 1

Івано-Франківський національний медичний

університет МОЗ України

вул. Галицька, 2, Івано-Франківськ, 76018, Україна

тел.: +38 (099) 314-81-08

e-mail: bodja.ua@gmail.com

ORCID 0000-0002-7822-785X

Вступ. Методи лікування відкритих ран і хронічних виразок передбачають використання асептичного перев'язувального матеріалу і антисептичних засобів, які знищують наявну патогенну мікрофлору в рані, попереджають її подальший розвиток і створюють необхідні умови для регенерації пошкоджених тканин. Поява мультирезистентних штамів мікроорганізмів знижує ефективність лікування та вимагає розробки нових підходів до терапії ранових процесів. Одним з перспективних напрямків лікування даної патології є фотодинамічна терапія з застосуванням зовнішніх фотосенсибілізаторів.

Метою досліджень є з'ясування ефективності синергічної дії червоного світла (660 нм) та різних концентрацій розчину метиленового синього на інгібування *in vitro* росту *Staphylococcus aureus*.

Матеріали та методи. Використали гідрогелі на основі кополімеру декстран-поліакриламід з різним ступенем зшивки 0,2%, 0,4%, 0,6% (w/w) для дослідження швидкості входу та виходу водного розчину метиленового синього. Мікробіологічні дослідження проведено на диких штаммах *S. aureus*, виділених на елективному середовищі «жовтково-сольовий агар». Оцінку ефективності бактерицидної дії метиленового синього проводили на агарі Мюллера-Хінтона № 2 аналогічного диско-дифузному методу оцінки резистентності мікроорганізмів до антибіотиків. Для опромінення посівів штамів *S. aureus* різними довжинами хвиль використали прилад «LIKA-Led» (Фотоніка Плюс) зі світлодіодними випромінювачами із довжинами хвиль 390 нм, 460 нм і 660 нм. Потужність випромінювання для кожної довжини хвилі становила 100 мВт, тривалість — 20 хв; 30 хв; 40 хв. Відповідно тривалості, доза опромінення склала 21 Дж/см², 31,5 Дж/см², 42,1 Дж/см². Математичну та статистичну обробку даних проводили у програмному пакеті Originlab 8.0.

Результати. Збільшення кількості зшиваючого агента у гідрогелі на основі кополімеру декстран-поліакриламід забезпечує зниження швидкості дифузії метиленового синього у гідрогелі. Ультрафіолетове випромінювання (390 нм) забезпечує зниження кількості колоній *S. aureus* на 80% при експозиції 20 хв. Подальше збільшення експозиції не сприяє значним змінам цього показника. Синє світло (460 нм) знижує присутність даного штаму мікроорганізмів на 66% при 20 хв експозиції і досягає рівня дії ультрафіолетового випромінювання при експозиції 30 хв. Червоне світло (660 нм) не проявляло бактерицидної дії. Мінімальну активність бактерицидної дії виявлено для метиленового синього у концентраціях 0,001% та 0,0001% — 6 мм. Синергічна дія 0,001% метиленового синього та червоного світла сприяє зростанню протимікробної дії на 40% (до 10 мм).

Висновки. З метою фотоінактивації *Staphylococcus aureus* доцільно застосовувати низькоенергетичне червоне світло з довжиною хвилі 660 нм у комплексі з насиченими метиленовим синім (0,001%) гідрогелями. Синергічна дія червоного світла та метиленового синього забезпечує генерацію активних радикалів (синглетного кисню), що затримує ріст мікроорганізмів у досліджуваному матеріалі.

Ключові слова: фотоінактивація бактерій, фотосенсибілізатори, червоне світло, синє світло, ультрафіолетове світло, метиленовий синій.

PHOTOINACTIVATION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN VITRO BY RED LIGHT (660 NM) IN THE PRESENCE OF METHYLENE BLUE

P.A. Virych¹, O.M. Nadтока¹, P.A. Virych², N.V. Kutsevol¹,
V.M. Krysa³, B.V. Krysa³, V.S. Martynyuk⁴

¹Taras Shevchenko National University of Kyiv
12, Lva Tolstogo Str., Kyiv, 03033, Ukraine

²SE "Kolomiychenko Institute of Otolaryngology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine"
3, Zoological Str., Kyiv, 03680, Ukraine

³Ivano-Frankivsk National Medical University for the Ministry of Health of Ukraine
2, Halytska Str., Ivano-Frankivsk, 76018, Ukraine

⁴Educational and Scientific Centre "Institute of Biology", Taras Shevchenko National University of Kyiv
2, Glushkov Av., Kyiv, 03022, Ukraine
E-mail: sphaenodon@ukr.net

Introduction. Open wounds and ulcers treatment involves the use of bandage material, antibiotics and antiseptic to prevent the development of a pathogenic microflora and to provide the necessary conditions for tissue regeneration. An emergence of multi-resistant strains of microorganisms reduces the effectiveness of such technology and requires the new treatment approaches. One of the promising areas is a photodynamic therapy with the use of external photosensitizers.

The aim of the investigation is to determine the effectiveness of the synergistic action of red light (660 nm) and different concentrations of methylene blue on the inhibition of *Staphylococcus aureus* growth.

Materials and methods. We used the hydrogels based on the copolymers dextran-polyacrylamide with the different concentration of crosslinking agent 0.2%, 0.4%, 0.6% (w/w) for investigation a rate of diffusion methylene blue into and out from hydrogel. Microbiological research was performed on wild strains of *S. aureus* isolated on a Yolk-salt agar. The evaluation of a bactericidal action of methylene blue was carried out on a Müller-Hinton No. 2 agar similarly to the disc-diffusion method for assessing the resistance of microorganisms to antibiotics. For irradiation by different wavelengths was used «LIKA-Led» (Photonics Plus) LEDs 390 nm, 460 nm and 660 nm. The radiation power for each wavelength was 100 mW, duration — 20 min, 30 min, 40 min. According to the duration, the irradiation doses were 21 J/cm², 31.5 J/cm², 42.1 J/cm². Mathematical and statistical data processing was performed in the OriginLab 8.0 software package.

Results. Increasing the amount of crosslinking agent in the hydrogel based on the copolymer dextran-polyacrylamide provides a decrease in the diffusion rate of methylene blue from the hydrogel. 390 nm ultraviolet radiation reduces the number of *S. aureus* colonies for 80% at 20 min exposure. Further increase in the exposure did not contribute to significant changes in this indicator. Blue light (460 nm) reduces the presence of this strain of microorganisms for 66% at 20 min exposure and reaches the effect of UV at 30 min exposure. Red light (660 nm) has no bactericidal effect. Minimal activity was found for methylene blue at concentrations of 0.001% and 0.0001% which was around 6 mm. The synergistic effect of 0.001% methylene blue and red light increases the activity for 40% up to 10 mm.

Conclusions. For the photoinactivation of *Staphylococcus aureus*, it is advisable to use a low energy red light with a 660 nm wavelength in combination with a saturated methylene blue (0.001%) hydrogels. Perhaps the synergistic action of red light and dye provides a generation of active radicals that contribute to the growth retardation of microorganisms.

Key words: photoinactivation of bacteria, photosensitizers, red light, blue light, ultraviolet light, methylene blue.

ФОТОИНАКТИВАЦІЯ *IN VITRO* *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* КРАСНИМ СВЕТОМ (660 НМ) В ПРИСУТСТВІІ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО

П.А. Вирьч¹, О.Н. Надтока¹, П.А. Вирьч², Н.В. Куцевол¹,
В.М. Крыса³, Б.В. Крыса³, В.С. Мартынюк⁴

¹Київський національний університет ім. Т. Шевченка

ул. Льва Толстого, 12, г. Киев, 03033, Украина

²ГУ «Институт отоларингологии им. проф. О.С. Коломийченка НАМН Украины»

ул. Зоологическая, 3, г. Киев, 03680, Украина

³Ивано-Франковская государственная медицинский университет МЗ Украины

ул. Галицкая, 2, Ивано-Франковск, 76018, Украина

⁴Київський національний університет ім. Т. Шевченка, ННЦ «Институт биологии и медицины»

просп. Глушкова, 2, Киев, 03022, Украина

Введение. Методы лечения открытых ран и хронических язв предусматривают использование асептического перевязочного материала и антисептических средств, которые уничтожают имеющуюся патогенную микрофлору в ране, предупреждают её дальнейшее развитие и создают необходимые условия для регенерации поврежденных тканей. Появление мультирезистентных штаммов микроорганизмов снижает эффективность лечения и требует разработки новых подходов к лечению. Одним из перспективных направлений является фотодинамическая терапия с применением внешних фотосенсибилизаторов.

Целью исследований является выяснение эффективности синергического действия красного света (660 нм) и различных концентрации метиленового синего на ингибирование *in vitro* роста *Staphylococcus aureus*.

Материалы и методы. Использовали гидрогели на основе сополимера декстран-полиакриламид с разной степенью сшивки 0,2 %, 0,4 %, 0,6 % (w/w) для исследования скорости входа и выхода метиленового синего. Микробиологические исследования проведены на диких штаммах *S. aureus* выделенных на селективной среде «Желтково-солевой агар». Оценку эффективности бактерицидного действия метиленового синего проводили на агаре Мюллера-Хинтона № 2 аналогично диско-диффузному методу оценки резистентности микроорганизмов к антибиотикам. Для облучения различными длинами волн использовали прибор «LIKA-Led» (Фотоника Плюс) со светодиодными излучателями с длинами волн 390 нм, 460 нм и 660 нм. Мощность излучения для каждой длины волны составляла 100 мВт, продолжительность — 20 мин; 30 мин; 40 мин. Согласно продолжительности, доза облучения составляла 21 Дж/см², 31,5 Дж/см², 42,1 Дж/см². Математическую и статистическую обработку данных проводили в программном пакете Originlab 8.0.

Результаты. Увеличение количества сшивающего агента в гидрогелях на основе сополимера декстран-полиакриламид обеспечивает снижение скорости диффузии метиленового синего из гидрогеля. Ультрафиолетовое излучение (390 нм) обеспечивает снижение количества колоний *S. aureus* на 80 % при экспозиции 20 мин. Дальнейшее увеличение экспозиции не способствует значительным изменениям этого показателя. Синий свет (460 нм) снижает присутствие данного штамма микроорганизмов на 66 % при 20 мин экспозиции и достигает уровня воздействия ультрафиолетового излучения при экспозиции 30 мин. Красный свет (660 нм) не оказывает бактерицидного действия. Минимальную бактерицидную активность метиленового синего выявлено в концентрациях 0,001% и 0,0001% — 6 мм. Синергическое действие 0,001% метиленового синего и красного света способствует увеличению противомикробной активности на 40 % (до 10 мм).

Выводы. С целью фотоинактивации *Staphylococcus aureus* целесообразно применять низкоэнергетический красный свет с длиной волны 660 нм в комплексе с насыщенными метиленовым синим (0,001%) гидрогелями. Синергическое действие красного света и метиленового синего обеспечивает генерацию активных радикалов, которые способствуют задержке роста микроорганизмов.

Ключевые слова: фотоинактивация бактерий, фотосенсибилизаторы, красный свет, синий свет, ультрафиолетовый свет, метиленовый синий.

Вступ

У клінічній практиці при лікуванні ранових процесів застосовують асептичний перев'язувальний матеріал, який закриває поверхню рани від інфікування і одночасно підтримує вологе середовище на поверхні рани, яке сприяє регенерації тканин. Такі умови також сприяють розмноженню патогенної мікрофлори, яка конститутивно присутня на шкірі. Розмноження мікрофлори у рані

спричиняє розвиток патологічних процесів, які перешкоджають її загоєнню. Для попередження таких наслідків застосовують розчини антибіотиків або антисептиків, які мають бактерицидну або бактеріостатичну дію і забезпечують необхідний лікувальний ефект. Проте швидкий розвиток резистентності мікроорганізмів знижує ефективність дії антибіотиків. Альтернативою є засоби на основі неорганічних сполук: іони, оксиди металів і їх нано-

частинки, хелати та інші. Вони забезпечують неселективну дію і на відміну від впливу антибіотиків на грам-позитивні та грам-негативні мікроорганізми, мають множинні механізми дії [1]. Ще одним перспективним напрямком терапії ранових процесів та хронічних виразок є застосування фотодинамічної терапії. Видиме світло володіє сильними дезінфікуючими властивостями, хоча цей факт менш відомий ніж інактивація мікроорганізмів ультрафіолетовим випромінюванням. На відміну від високоенергетичного УФ-випромінювання, видиме світло менш шкідливе [2]. Його можна застосовувати з меншими ризиками при опроміненні тканин організму. Важливим елементом бактерицидної дії такого світла є наявність бактеріальних фотосенсибілізаторів. З'ясовано присутність таких сполук, які при поглинанні світла у діапазоні 405–470 нм руйнують або сприяють утворенню засобів, які порушують метаболізм мікроорганізмів [3,4]. Поглинання у цій області забезпечується різними типами порфіринів: копропорфірин III, протопорфірин IX, уропорфірин III та інші, що виконують функції внутрішніх фотосенсибілізаторів [3,5].

Для збільшення бактерицидної активності певних довжин світлового випромінювання застосовують фотосенсибілізатори, які при поглинанні світла здатні генерувати активні радикали або взаємодіяти з клітинними мішенями, інактивуючи їх. Це насамперед барвники з максимумами поглинання у червоній та зеленій областях видимого діапазону електромагнітних коливань. Ці ділянки спектру практично не виявляють патогенної дії на бактерій, але при додаванні у середовище фотосенсибілізатора, здатні викликати їх загибель [6]. Серед таких сполук найбільш відомим є метиленовий синій. Максимум поглинання його водних розчинів знаходиться в червоній ділянці спектра 668 нм. При димеризації відбувається зсув у короткохвильову область до 612 нм. Метод фотодинамічної терапії базується на взаємодії видимого світла та фотосенсибілізатора, який при фотоактивації генерує короткоживучі цитотоксичні види радикалів. Після фотостимуляції фотосенсибілізатор переходить з синглетного у триплетний стан за механізмами міжсистемних переходів, який, у свою чергу, вступає у реакцію з навколишніми молекулами, генеруючи різні радикали та перекис водню або здатен передавати свою енергію на молекулярний кисень з утворенням його синглетного стану. Утворені вільні радикали та синглетний кисень взаємодіють з різними клітинними мішенями, в тому числі мембранами, нуклеїновими кислотами та ензиматичними комплексами, порушуючи їх функціонування [6].

Використання матеріалів, насичених такими фотосенсибілізаторами, значно підвищує ефективність їх дії завдяки тривалій підтримці необхідних терапевтичних концентрацій речовини у місці ураження. Полімери з високим вмістом води, низькою

токсичністю та високою біосумісністю, так звані гідрогелі, застосовують саме з метою попередження або лікування бактеріальної контамінації ран [1]. Їх структура дозволяє утримувати необхідну кількість лікарської речовини та з певною швидкістю вивільняти її в навколишнє середовище.

Згідно наведених даних, ми перевіряли бактерицидну активність насичених метиленовим синім гідрогелів на основі кополімерів декстран-поліакриламід при їх опроміненні різними довжинами хвиль.

Матеріали та методи

У дослідженнях використано гідрогелі на основі кополімеру декстран-поліакриламід з варіюванням кількості зшиваючого агента N,N'-метилен-біс-акриламід 0,2 %, 0,4 %, 0,6 % [7]. Для синтезу використовували декстран від Fluka з $M_w = 2 \times 10^5$ г/моль, акриламід від Sigma-Aldrich, N,N'-метилен-біс-акриламід від Sigma-Aldrich. Синтез гідрогелів детально описано у [7]. Для насичення гідрогелів метиленовим синім (Fluka) готували маточний розчин 1% з наступним розведенням до необхідної концентрації.

Оцінка швидкості дифузії метиленового синього.

Для оцінки швидкості дифузії низькомолекулярних речовин у досліджених гідрогелях використовували розчин метиленового синього у концентрації 25×10^{-5} %, що має максимум поглинання у діапазоні 668 нм та найвищу чутливість виявлення змін концентрації. Вищі концентрації барвника сприяють його димеризації і появі додаткового максимуму поглинання, які спотворюватимуть отримані результати.

Насичення матеріалу проводили у 50 мл 25×10^{-5} % метиленового синього протягом 24 год. Використовували гідратований гідрогель. Вимірювання здійснювали з інтервалом 10 хв протягом 150 хв до досягнення рівноважної концентрації барвника у розчині. Відношення гідрогель : вода = 1 : 4. Для розрахунку швидкості виходу барвника проводили розрахунок першої похідної рівняння наростання концентрації у часі. Для цього отриману криву лінеаризували у логарифмічних координатах часу ($\ln t$) та оптичного поглинання ($\ln D$) з наступним фітуванням за лінійним законом. Кут нахилу отриманої кривої відповідає швидкості наростання функції, або її першій похідній. Враховуючи коливання оптичного поглинання, пов'язані з особливостями вимірювання, ми отримали незначні відхилення від лінійного діапазону, що вкладаються у допустимі рамки.

Аналогічно здійснювали вимірювання абсорбції метиленового синього (25×10^{-5} %) протягом 150 хв з інтервалом 10 хв до досягнення рівноважної концентрації барвника. Відношення гідрогель : розчин метиленового синього = 1 : 4.

Математичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою програми OriginLab 8.0. Повторність досліду чотирикратна.

Мікробіологічні дослідження.

У дослідженнях використовували дикі штами *Staphylococcus aureus*, отримані на елективному середовищі «Жовтково-сольовий агар». Це тверде поживне середовище для диференційованого вирощування стафілококів, яке містить 10% хлориду натрію. Присутність яєчного жовтка дозволяє виявити фермент лецитиназу (лецитовітеллазу), яку продукують піогенні стафілококи. Лецитиназа розщеплює лецитин на фосфорхоліни та нерозчинні у воді дигліцериди, тому середовище навколо лецитиназопозитивних колоній мутніє і з'являється райдужний ореол.

Склад:

1. М'ясо-пептонний агар (МПА) — 70% (v/v).
 2. Хлорид натрію — 10% (v/w).
 3. Жовткова емульсія в 0,9% NaCl — 20% (v/v).
- pH = 7,3.

Оцінку чутливості вибраних штамів мікроорганізмів до дії світла та метиленового синього проводили на твердому середовищі згідно рекомендацій наказу № 167 МОЗ від 05.04.2007. Методичні вказівки «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів». Для досліджень використовували агар Мюллера-Хінтона № 2 наступного складу:

1. Гідролізат казеїну — 17,5 г/л.
 2. Гідролізат серця — 2 г/л.
 3. Крохмаль водорозчинний (ЧДА) — 1,5 г/л.
 4. Агар-агар — 17 г/л.
- pH = 7,3

Для досліджень чашку Петрі розділяли на 4 сектори: 1 — контроль, 2 — опромінення відповідною довжиною хвилі, 3 — гідрогель з метиленовим синім, 4 — гідрогель з метиленовим синім + опромінення світлом.

Для опромінення використовували прилад «ЛІКА-Led» (Фотоніка Плюс) зі світлодіодними випромінювачами із довжинами хвиль 390 нм, 460 нм та 660 нм. Потужність випромінювання для кожної довжини хвилі становила 100 мВт, тривалість — 20 хв; 30 хв; 40 хв. Відповідно тривалості, доза опромінення становила 21 Дж/см², 31,5 Дж/см², 42,1 Дж/см². Насичення гідрогелю метиленовим синім проводили у розчинах з концентрацією барвника 0,0001% та 0,001% протягом 12 год. Ефективність дії гідрогелів, насичених метиленовим синім, визначали за змінами зони затримки росту культури бактерій навколо зразка, аналогічно диско-дифузійному методу визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків. Бактерицидну дію світла визначали за зміною кількості колоній *S. aureus* у зоні опромінення. У цьому випадку використовували розведену суспензію бактерій до концентрації близько 10⁵ у 1 мл. Кон-

троль проводили підрахунком кількості колонієутворюючих одиниць (КУО) у камері Горяєва після фарбування аліквоти суспензії акридиновим помаранчевим з кінцевою концентрацією барвника 0,001%. Люмінесценцію досліджували при довжині хвилі емісії — 530 нм. Акридиновий помаранчевий при зв'язуванні з нуклеїновими кислотами утворює флуоресцентні комплекси: з ДНК — з емісією у зеленій ділянці спектра і РНК — помаранчевій. Повторність дослідів восьмикратна.

Результати

Швидкість дифузії метиленового синього.

Дослідженням абсорбції метиленового синього у матеріалах виявили залежність швидкості процесу від кількості зшиваючого агента, що відповідає щільності полімерної сітки. Формування рівноважного стану при вивченні абсорбції барвника у гідрогель спостерігали через 130–150 хв (рис. 1). При цьому виявлено залежність швидкості поглинання від кількості зшиваючого агента: 0,2% — 0,1012 хв⁻¹, 0,4% — 0,0762 хв⁻¹, 0,6% — 0,0693 хв⁻¹.

Десорбція поглиненої речовини вказує на потенційні можливості до застосування тих чи інших лікарських засобів, що забезпечує створення та підтримку терапевтичних концентрацій діючої речовини в місці локалізації гідрогелю.

Швидкість дифузії метиленового синього з кополімеру декстран-20000 — акриламід з різною кількістю зшиваючого агента представлено на рис. 2. Виявлено формування рівноваги через 150 хв для всіх зразків, за умови використання гідрогелю, що насичений 25 × 10⁻⁵% барвником. Швидкість процесу зростає по мірі зниження щільності сітки матеріалу. Показник для гідрогелю з 0,2% біс-акриламідів (w/w) становить 0,3956 хв⁻¹, 0,4% — 0,3518 хв⁻¹ та 0,6% — 0,3255 хв⁻¹.

Мікробіологічні дослідження

Опромінення світлом *S. aureus* на межі видимого і ультрафіолетового діапазону (390 нм) з дозуванням 21 Дж/см², 31,5 Дж/см², 42,1 Дж/см² сприяє зниженню кількості колоній мікроорганізмів до 20% від початкової кількості (рис. 3). Подальше збільшення експозиції не сприяє значним змінам цього показника і при тривалості опромінення 40 хв з дозою 42,1 Дж/см² кількість колоній *S. aureus* становить 11% від початкової. Аналогічне дозування синього світла (460 нм) дозволяє з меншою ефективністю знизити початкову кількість КУО. Доза опромінення 21 Дж/см² сприяє зниженню показника на 66%, 31,5 Дж/см² — 80%, 42,1 Дж/см² — 85%. Отже, ефективність фотоінактивації культури *S. aureus* світлом в діапазоні 460 нм більш залежна від кількості енергії, що подається, і як наслідок, тривалості експозиції.

Для надання бактерицидних властивостей у червоній ділянці спектру ми використали гідрогелі, насичені розчином метиленового синього.

Максимуми поглинання його мономерної форми знаходяться у червоній ділянці спектру (668 нм), а димерної — зсунуті у короткохвильовий діапазон (612 нм). При фотоактивації червоним світлом метиленовий синій здатен генерувати активні форми кисню (синглетний кисень), які мають патогенну дію на мікрофлору. Проведені нами дослідження виявили незначну бектерицидну дію на грам-позитивну мікрофлору (*S. aureus*) з затримкою росту на площі діаметром близько 6–7 мм при концентраціях 0,001 % та 0,0001 % (рис. 4).

Збільшення концентрації метиленового синього до 0,001 % та дози червоного світла (660 нм) до 42,1 Дж/см² сприяє зростанню цього показника до 9–10 мм. Отже, кополімери декстран-20 000 — поліакриламід, насичені 0,001 % розчином метиле-

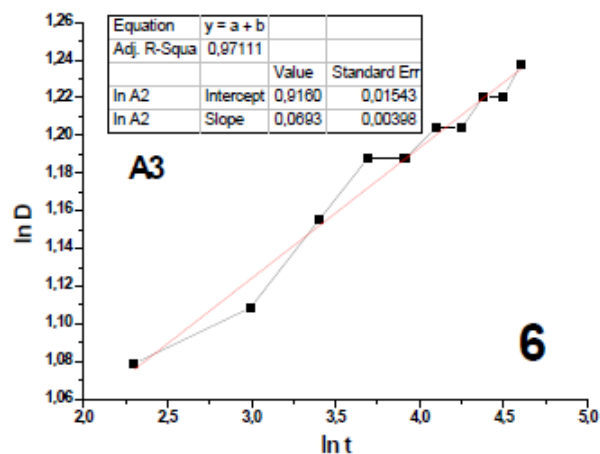
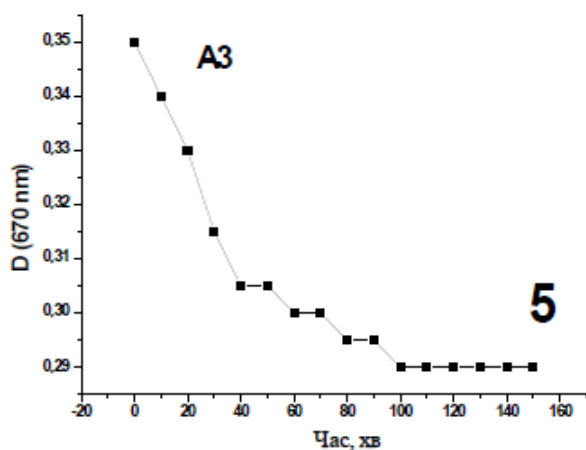
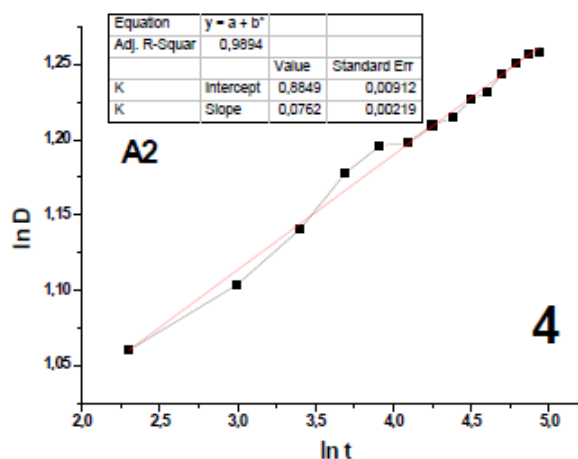
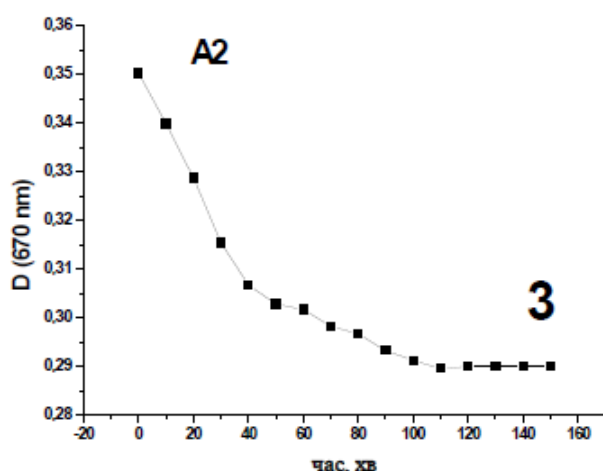
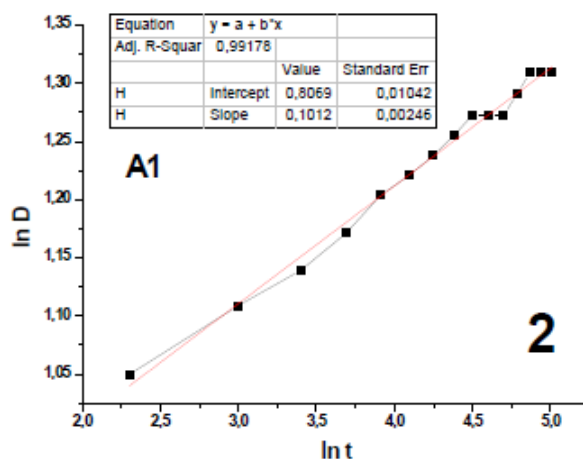
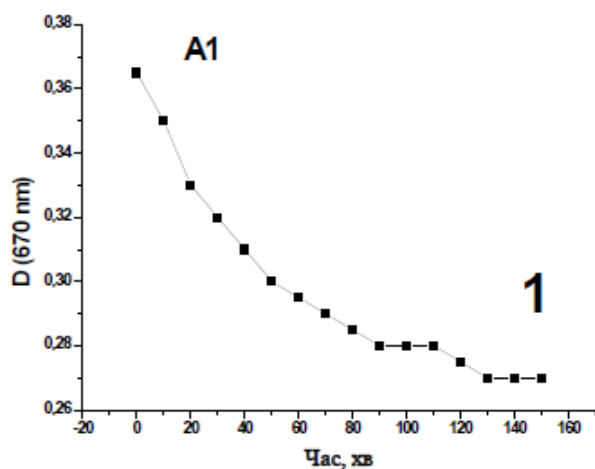


Рис. 1. Дифузія (1, 3, 5) метиленового синього у кополімер декстран-20 000 — акриламід з кількістю зшиваючого агента 0,2 % (w/w) (A1), 0,4 % (w/w) (A2), 0,6 % (w/w) (A3) та розрахунок швидкості процесу дифузії (2, 4, 6)

нового синього у комплексі з червоним світлом виявляють вищу бактерицидну дію, ніж окремо пігмент та опромінення червоним світлом.

Обговорення

Отримані результати зміни швидкості дифузії метиленового синього дозволяють готувати матеріали, насичені барвником з необхідною

швидкістю виходу його у навколишнє середовище. Це дозволяє тривалий час підтримувати задану терапевтичну концентрацію барвника у місці локалізації гідрогелю. Зважаючи на різну швидкість метаболізму мікроорганізмів, такі результати є корисними для прикладної медицини. Зв'язування барвника з різними структурами бактеріальної клітини, такими як пептидоглікани, поліфосфати

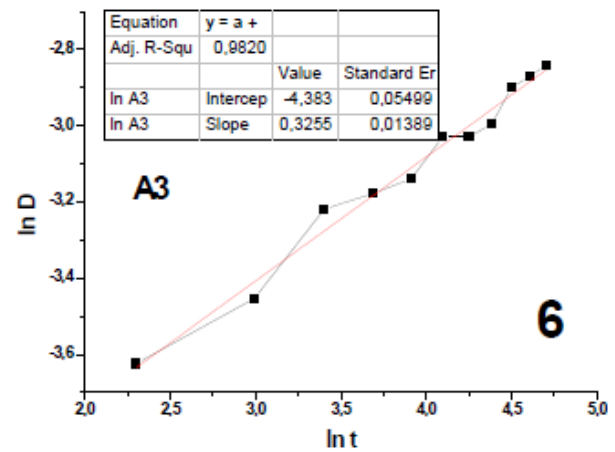
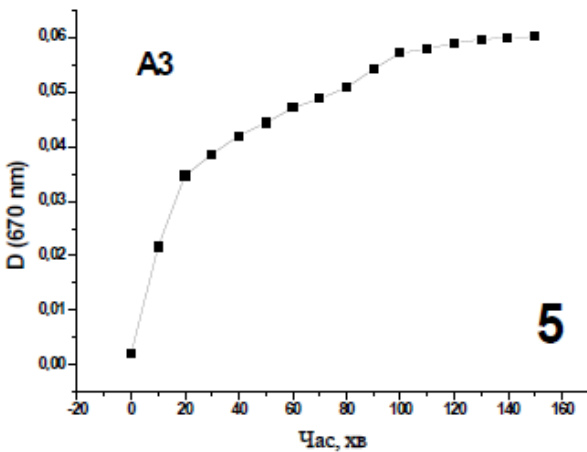
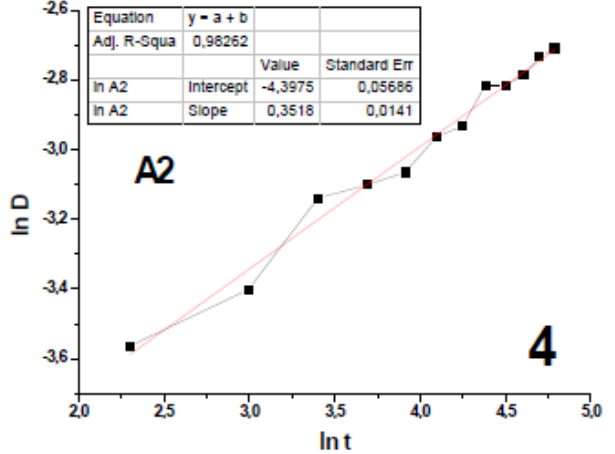
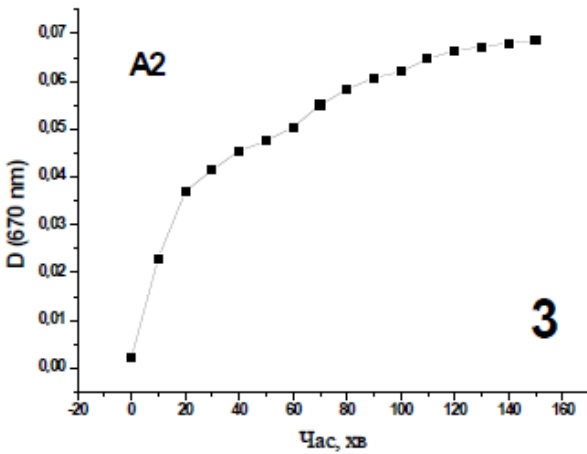
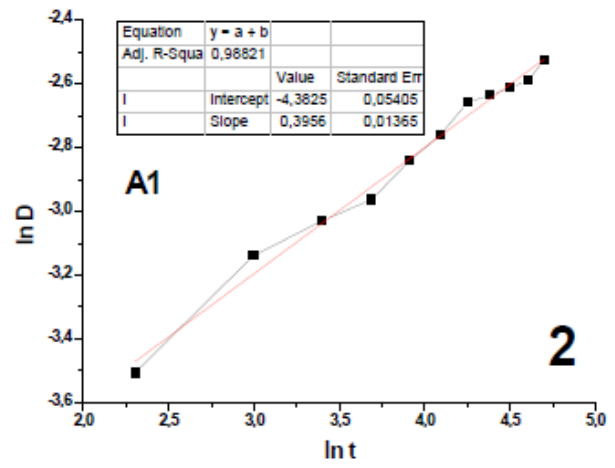
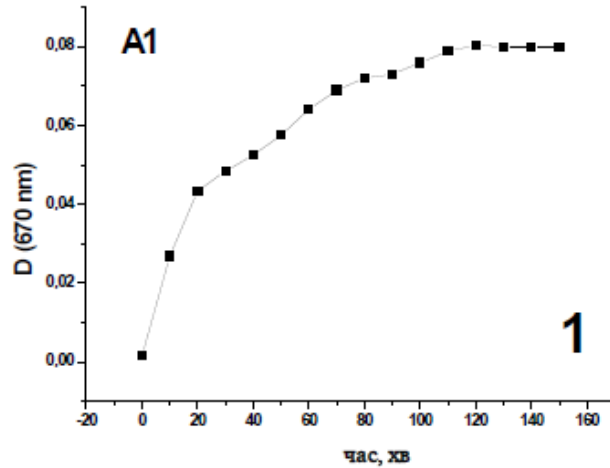


Рис. 2. Дифузія (1, 3, 5) метиленового синього з кополімеру декстран-20 000 — акриламід з кількістю зшиваючого агента 0,2 % (w/w) (A1), 0,4 % (w/w) (A2), 0,6 % (w/w) (A3) та розрахунок швидкості процесу дифузії (2, 4, 6)

та інші складові, підвищує його ефективність при проведенні фотодинамічної терапії. Отримані результати дозволяють формувати припущення про швидкість насичення низькомолекулярними лікарськими засобами та неорганічними сполуками, такими як водорозчинні солі металів, їх оксиди та інші речовини за умови відсутності формування агрегатів, що перешкоджатимуть дифузії.

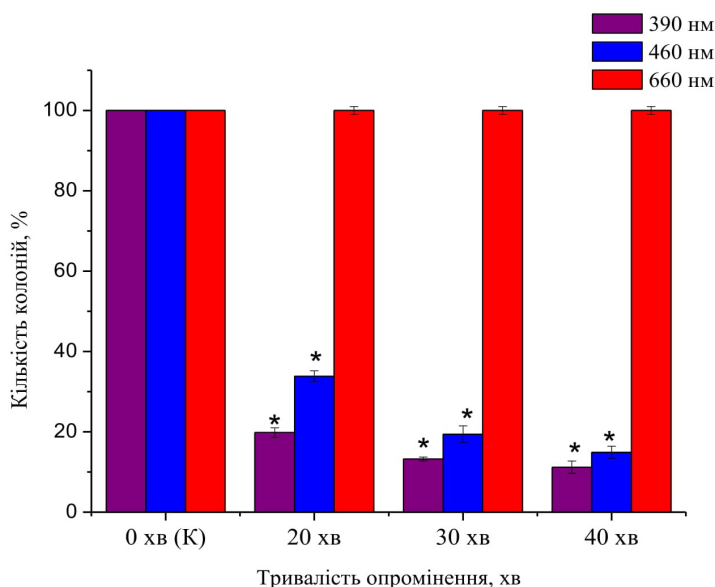


Рис. 3. Бактерицидна дія світла видимого діапазону з довжинами хвиль 390 нм, 460 нм, 660 нм та потужністю випромінювання 100 мВт на культуру *S. aureus* при різній тривалості експозиції — 20 хв, 30 хв, 40 хв (* $p < 0,05$)

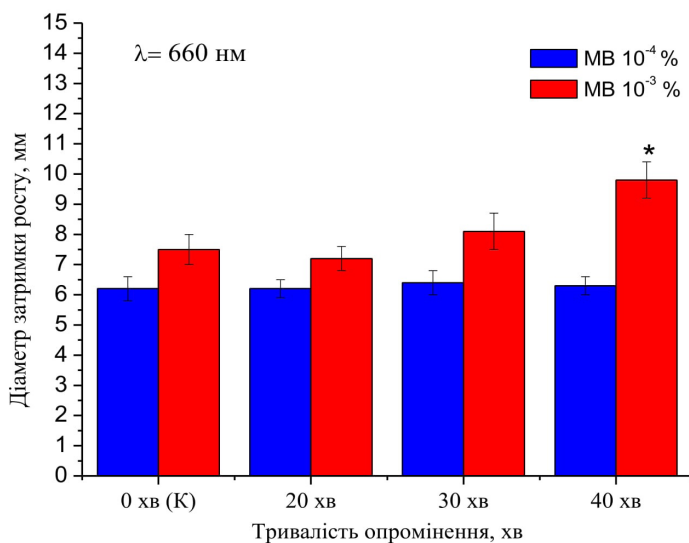


Рис. 4. Комплексна бактерицидна дія червоного світла 660 нм з потужністю випромінювання 100 мВт та метиленового синього (10⁻⁴, 10⁻³ %) у кополімері декстран-20 000 — поліакриламід на культуру *S. aureus* при різній тривалості експозиції 20 хв, 30 хв, 40 хв (* $p < 0,05$)

Поступове збільшення концентрації метиленового синього та її підтримка в середовищі забезпечує неперервне надходження барвника у прокаріотичні клітини, а додаткове опромінення червоним світлом діапазону 660 нм викликає генерацію синглетного кисню і активних радикалів. Разом з тим, певні довжини хвиль здатні самостійно знищувати мікроорганізми. Зокрема, таку дію має високоенергетичне ультрафіолетове опромінення на межі видимого діапазону 390 нм. Цю ділянку спектру застосовують для інактивації мікроорганізмів різних видів [8]. Мішенями дії синього світла (460 нм) є група гемопорфіринів, які входять до складу системи електронтранспортного ланцюга дихання. Вони відіграють важливу роль у окисно-відновних процесах. Для довгохвильової ділянки видимого спектру світла практично не ідентифіковано внутрішніх фотосенсибілізаторів у прокаріоті за винятком бактеріохлорофілів та бактеріородопсинів архей [9,10]. Бактеріохлорофіли та інші пігменти притаманні фотосинтезуючим прокаріотам. Максимуми їх поглинання знаходяться в інфрачервоній області — 800 нм, 850 нм, 900 нм [11]. Родопсини виконують функцію світлочутливих молекул, що попереджають бактерії про вплив шкідливого випромінювання. Максимуми їх поглинання знаходяться у межах 500 нм. Низькоенергетичне червоне світло у діапазоні 660 нм не поглинається внутрішньоклітинними бактеріальними фотосенсибілізаторами, тому воно не виявляє бактерицидної дії.

Враховуючи можливий патогенний вплив короткохвильового діапазону видимого спектру світла на еукаріотичні клітини та тканини, доцільно застосовувати з терапевтичною метою довгохвильове випромінювання. Для підвищення його бактерицидної активності варто використовувати фотосенсибілізатори, які здатні при збудженні утворювати активні молекули, які взаємодіють з ключовими складовими бактеріальних клітин. Крім того, літературні дані вказують на значні енергії опромінення червоним світлом (650–700 нм) для інактивації різних видів мікроорганізмів [8]. Для зменшення концентрації *Escherichia coli* у 10 разів необхідна енергія 1 700 300 Дж/см² (660 нм), 13 000 000 Дж/см² (730 нм); *S. aureus* — 34,8 Дж/см² (660 нм) [8]. Виявлена синергічна дія метиленового синього та червоного світла (660 нм) ефективніша ніж окремі складові. Діапазон синергічної бактерицидної дії складає 3–4 мм навколо гідрогелю порівняно з 1 мм при використанні лише метиленового

синього. Отримані результати вказують на потенційні можливості застосування даної методики з отриманням бактерицидної та бактериостатичної дії при лікуванні ранових процесів та хронічних виразок. Крім того, існують дані підвищення регенерації тканин під дією низькоенергетичного лазерного та LED випромінювання заданої довжини хвилі, в тому числі підвищення проліферації фібробластів, грануляції формування тканин, синтезу колагену та стимуляції ангиогенезу [12].

Висновки

Враховуючи отримані результати дослідження, з метою фотоінактивації *Staphylococcus aureus in vitro* доцільно застосовувати низькоенергетичне червоне світло з довжиною хвилі 660 нм у комплексі з гідрогелями, насиченими метиленовим синім (0,001 %). Синергічна дія червоного світла (660 нм) та метиленового синього забезпечує генерацію активних радикалів, які *in vitro* сприяють затримці росту мікроорганізмів, що може бути використано при лікуванні ранових процесів та хронічних виразок.

Література

- Li S, Dong S, Xu W, Tu S, Yan L, Zhao C, Ding J, Chen X. Antibacterial Hydrogels. *Advanced science* (Weinheim, Baden-Württemberg, Germany), 2018;5(5):1700527. doi:10.1002/advs.201700527
- Ramakrishnan P, Maclean M, MacGregor S, Anderson J, Grant M. Cytotoxic responses to 405nm light exposure in mammalian and bacterial cells: Involvement of reactive oxygen species. *Toxicol In Vitro*, 2016;33:54-62. doi:10.1016/j.tiv.2016.02.011
- Ashkenazi H, Malik Z, Harth Y, Nitzan Y. Eradication of *Propionibacterium acnes* by its endogenic porphyrins after illumination with high intensity blue light. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003;35(1): 17-24.
- Guffey J, Wilborn J. In vitro bactericidal effects of 405-nm and 470-nm blue light. *Photomed Laser Surg*, 2006;24(6):684-8.
- Feuerstein O, Ginsburg I, Dayan E, Veler D, Weiss E. Mechanism of visible light phototoxicity on *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. *Photochem. Photobiol.* 2005;81(5):1186-9.
- Mahmoudi H, Bahador A, Pourhajibagher M, Alikhani M. Antimicrobial Photodynamic Therapy: An Effective Alternative Approach to Control Bacterial Infections. *J Lasers Med Sci*, 2018;9(3): 154–60. doi:10.15171/jlms.2018.29
- Nadtoka O, Kutsevol N, Krysa V, Krysa B. (2018). Hybrid polyacryamide hydrogels: Synthesis, properties and prospects of application. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 2018;672(1): 1-10. doi:10.1080/15421406.2018.1542089
- Hessling M, Spellerberg B, Hoenes K. Photoinactivation of bacteria by endogenous photosensitizers and exposure to visible light of different wavelengths – a review on existing data. *FEMS Microbiol Lett*, 2017;364(2):fnw270. doi:10.1093/femsle/fnw270
- Yu J, Liang R, Liu F, Martínez T. First-Principles Characterization of the Elusive I Fluorescent State and the Structural Evolution of Retinal Protonated Schiff Base in Bacteriorhodopsin. *J Am Chem Soc*, 2019;141(45):18193-203. doi:10.1021/jacs.9b08941
- Kiang N, Siefert J, Govindjee BR. (2007). Spectral signatures of photosynthesis. I. Review of Earth organisms. *Astrobiology*, 2007;7(1):222-51.
- Oren A. Characterization of Pigments of Prokaryotes and Their Use in Taxonomy and Classification. *Methods in Microbiology*, 2011;38:261-82. doi:10.1016/B978-0-12-387730-7.00012-7
- Chaves M, Araujo A, Piancastelli A, Pinotti M. (2014). Effect of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2014;89(4):616-23. doi:10.1590/abd1806-4841.20142519.