

ФОТОБАКТЕРИЦИДНЫЕ СВОЙСТВА ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ГИДРОГЕЛЕВОГО НАНОКОМПОЗИТА С МЕТИЛЕНОВЫМ СИНИМ

Долинский Г.А., *Самченко Ю.М., *Пасмурцева Н.А.,
*Полторацкая Т.П., *Ульберг З.Р., Кислухина М.А., Гамалея Н.Ф.

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии
имени Р.Е. Кавецкого НАН Украины,
03022 Украина, г. Киев, ул. Васильковская, 45,
тел.: +38(044)258-16-58, e-mail: gydy@yandex.ua

*Институт биокolloидной химии имени Ф.Д. Овчаренко НАН Украины,
03680 Украина, г. Киев, бульвар Вернадского, 42,
тел.: +38(063)393-72-88, e-mail: yu1sam@yahoo.com

*Синтезирован гидрогелевый нанокomпозит, который при нагревании до температуры тела человека высвобождает в раствор сорбированный метиленовый синий, сохраняя его фотосенсибилизирующую активность. Смыть с поверхности гидрогеля, инкубированного в течение суток при 37 °С с культурами *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, после облучения лазером $\lambda = 658$ нм в дозе 15 Дж/см² и 30 Дж/см², соответственно, были изучены методом бактериологического посева на мясо-пептонный агар. Установлена выраженная фотобактерицидная активность нанокomпозита с метиленовым синим в отношении как грамположительной, так и грамотрицательной бактериальной культуры. Сделан вывод о перспективности его использования в качестве терморегулируемой системы доставки метиленового синего к очагу воспаления для проведения антибактериальной фотодинамической терапии.*

Ключевые слова: фотобактерицидная активность, метиленовый синий, гидрогелевый нанокomпозит, термоиницированная диффузия.

Введение

Антимикробная фотодинамическая терапия – одно из перспективных направлений борьбы с мультирезистентностью возбудителей инфекций мягких тканей, все чаще встречающейся в клинической практике [14]. В качестве фотосенсибилизаторов с этой целью широко применяются фенотиазиновые красители, наиболее известный из которых – метиленовый синий долгое время использовался как антисептик, не токсичный для организма в терапевтических дозах и обладающий большей тропностью к прокариотическим клеткам, чем к эукариотическим [10]. Высокий молярный коэффициент экстинкции при поглощении в диапазоне «окна проницаемости» биологических тканей и значительный квантовый выход образования синглетного кислорода обуславливают его привлекательность для получения фотодинамического эффекта, однако стандартные растворы метиленового синего, выпускаемые фармацевтической промышленностью, мало пригодны для этой цели потому, что при парентеральном введении быстро

метаболизируются с образованием лейко-формы, не обладающей фотохимической активностью [1]. Увеличение концентрации препарата также не дает желаемого результата, поскольку в присутствии электролитов в водных растворах происходит димеризация молекул метиленового синего и, хотя их адсорбция бактериальной стенкой усиливается [13], при облучении преобладают фотохимические реакции I типа, идущие с образованием свободных радикалов, а не синглетного кислорода [3].

В последние годы предложены разнообразные системы доставки фотосенсибилизатора, в частности, полимерные и неорганические наночастицы, при помощи которых обеспечивается его накопление в патологическом очаге [6, 9]. По нашему мнению, наибольшего внимания заслуживают так называемые «умные» гидрогели, которые способны резко и прогнозируемым образом изменять свои физико-химические параметры (степень набухания, пористость, диффузионную проницаемость, и т.п.) под воздействием незначительных изменений в окружающей среде [5]. Особый ин-

терес представляют термочувствительные гидрогели на основе N-изопропилакриламида, которые при нагревании переходят из развернутой конформации в компактное дегидратированное состояние, высвобождая сорбированные за счет водородных связей значительные количества воды [4, 7]. Зона фазового перехода между набухшим и сколлапсированным состоянием у этих гидрогелей близка к температуре человеческого тела и может сдвигаться в сторону более высоких или более низких температур при сополимеризации с гидрофильными или гидрофобными мономерами, соответственно [8].

Мы предположили, что описанная терморегулируемая система доставки будет не только предохранять метиленовый синий от нежелательной метаболизации, но и позволит оптимизировать его фармакокинетику в соответствии с применяемым протоколом фотодинамической терапии. Исходя из этого, **целью** данной работы было изучение *in vitro* фотобактерицидной активности метиленового синего, диффундирующего при температуре 37 °С из термочувствительного гидрогелевого нанокompозита в среду культивирования грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Материалы и методы

Синтез гидрогелевого нанокompозита осуществляли на основе N-изопропилакриламида (97%, Sigma-Aldrich, USA) и лапонита (Conservation Resources International LLC, UK), диспергированных в соотношении 3:1, выдерживая на ультразвуковой бане в течение 5 минут, после чего композицию продували азотом при температуре около 0 °С и помещали для проведения полимеризации между двумя стеклянными пластинами, разделенными спейсерами заданной толщины. Через сутки пластины разнимали и образованный нанокompозит отмывали от непрореагировавших остатков путем экстракции в воде в течение трех суток.

Образцы геля в виде дисков массой $7,8 \pm 0,5$ мг помещали при температуре 5 °С в 0,025 % водный раствор метиленового синего (Новохим, Украина) на 1 сутки. Насыщенные фотосенсибилизатором диски промывали гипертоническим раствором (1,2 % NaCl), оставляли на 24 ч в 1 мл изотонического раствора (0,9 % NaCl) при 37 °С, после чего регистрировали кривые абсорбции диффундировавшего из них метиленового синего при помощи спектрофотометра ND-1000 (NanoDrop, USA). В полученные пробы также вносили специфический флуоресцентный индикатор синглетного кислорода Singlet Oxygen Sensor Green (Molecular Probes, USA) до конечной концентрации 2 мкМ и облучали их красным светом полупроводнико-

вого лазера $\lambda = 658$ нм (Фотоника Плюс, Украина), устанавливая плотность мощности 25 мВт/см² при помощи измерителя Ophir Nova II (Ophir Optronics, Israel). Уровень продукции синглетного кислорода оценивали по интенсивности флуоресценции раствора в диапазоне $\lambda_{em} = 525-530$ нм, измеренной спектрофлуориметром ND-3200 (NanoDrop, USA) по достижении расчетных доз облучения 15 Дж/см² и 30 Дж/см².

Для микробиологических исследований гелевые диски обрабатывали в условиях стерильности, нанося на них по 20 мкл суспензии, приготовленной *ex tempore* из исходных культур *Staphylococcus aureus* либо *Escherichia coli* разведением физиологическим раствором (0,9 % NaCl) до содержания в 1 мл 4×10^4 колониеобразующих единиц (КОЕ). После инкубации в стерильных чашках Петри при 37 °С в течение суток половину образцов облучали лазером $\lambda = 658$ нм, при плотности мощности 25 мВт/см² и дозе 15 Дж/см² для *S. aureus* и 30 Дж/см² для *E. coli*. Смывы с облученных и необлученных гелей, сделанные стерильным физиологическим раствором, изучали методом посева на мясо-пептонном агаре, проводя учет роста микроорганизмов через 24 ч инкубации при 37 °С. В качестве контроля роста культур использовали посев таких же суспензий, выдержанных в течение суток при 37 °С в стерильных чашках Петри.

Статистическую обработку данных проводили средствами Пакета анализа Microsoft® Office Excell 2003.

Результаты и их обсуждение

Образцы геля после экспозиции в растворе метиленового синего значительно увеличивались в объеме, достигая массы $185,6 \pm 17,4$ мг (более чем в 20 раз выше исходной, $P < 0,001$) и приобретали интенсивно-синюю окраску. При этом оптическая плотность инкубационного раствора существенно снижалась (рис. 1).

Сорбционная способность гидрогеля, рассчитанная по разности измеренных концентраций метиленового синего, составила 28,2 мг/г. По-видимому, кроме поглощения вместе с растворителем в процессе набухания, проявлялся и концентрирующий эффект за счет взаимодействия N⁺ молекул фотосенсибилизатора с отрицательными зарядами на поверхности лапонита [2]. Поэтому оптическая плотность метиленового синего в геле была многократно выше, чем в насыщающем растворе, а пик абсорбции смещался в коротковолновую сторону (рис. 2).

Во время инкубации насыщенных гидрогелевых дисков в изотоническом растворе натрия

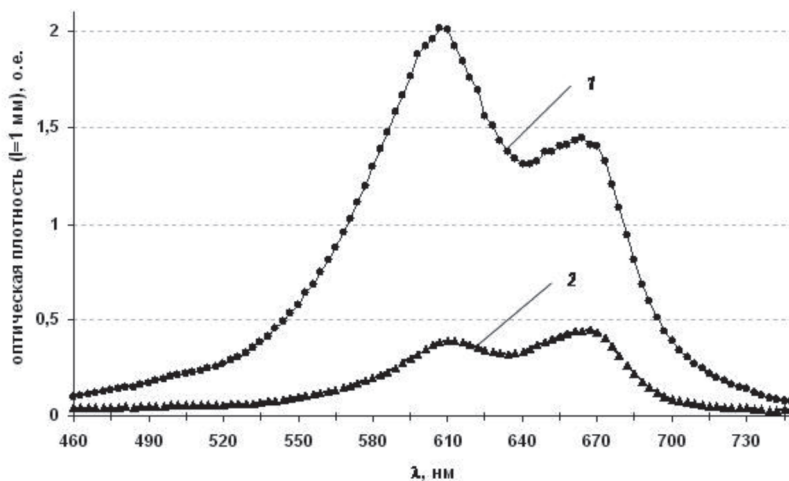


Рис. 1. Оптическая плотность 0,025 % раствора метиленового синего до (1) и после (2) инкубации в нем гидрогелевого диска в течение суток

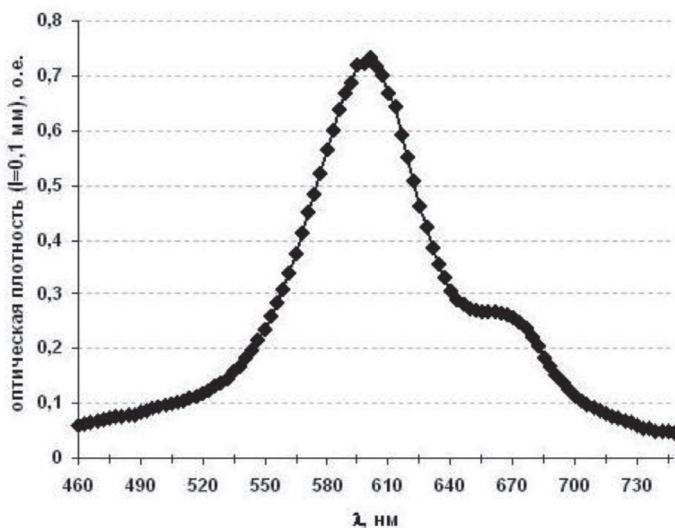


Рис. 2. Оптическая плотность гидрогелевого нанокompозита, насыщенного метиленовым синим в 0,025 % водном растворе при температуре 5 °C

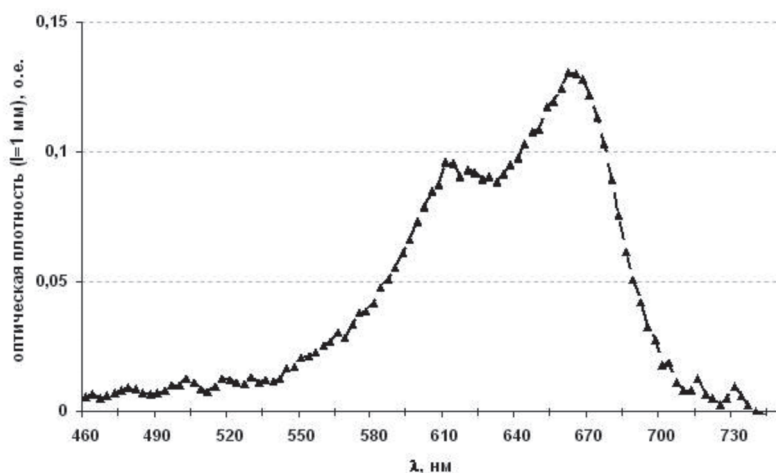


Рис. 3. Оптическая плотность раствора метиленового синего, полученного за счет диффузии из гидрогелевого диска в течение 24 ч инкубации в физиологическом растворе при 37 °C

хлорида при 37 °C происходила десорбция метиленового синего (рис. 3).

Два пика поглощения полученного раствора, свидетельствуют о присутствии как мономерной ($\lambda_{\text{abc}} = 660$ нм), так и димерной ($\lambda_{\text{abc}} = 610$ нм) формы фотосенсибилизатора. Поскольку при фотоактивации агрегированных молекул повышается вероятность реакций, связанных с переносом электронов, а не передачей энергии возбужденного состояния на кислород, соотношение мономерной и димерной форм метиленового синего влияет на уровень продукции синглетного кислорода [10]. Облучение лазером $\lambda = 658$ нм образовавшегося в результате десорбции из гидрогелевого носителя раствора с добавлением Singlet Oxygen Sensor Green сопровождалось появлением характерной флуоресценции в диапазоне $\lambda_{\text{em}} = 685\text{--}690$ нм, интенсивность которой возрастала с увеличением экспозиционной дозы, в то время как собственная флуоресценция метиленового синего в диапазоне $\lambda_{\text{em}} = 687$ нм оставалась на прежнем уровне (рис. 4).

Следовательно, после терминирующей диффузии из гидрогелевого нанокompозита метиленовый синий сохранял способность к фотоактивации, сопровождающейся дозозависимой генерацией синглетного кислорода.

Насыщенный метиленовым синим гель обладал бактерицидной активностью в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов, многократно усиливаемой за счет фотодинамического эффекта (рис. 5, 6).

В смывах с поверхности насыщенного метиленовым синим гидрогеля, наблюдалось снижение роста *Staphylococcus aureus* почти в 6 раз, по сравнению с

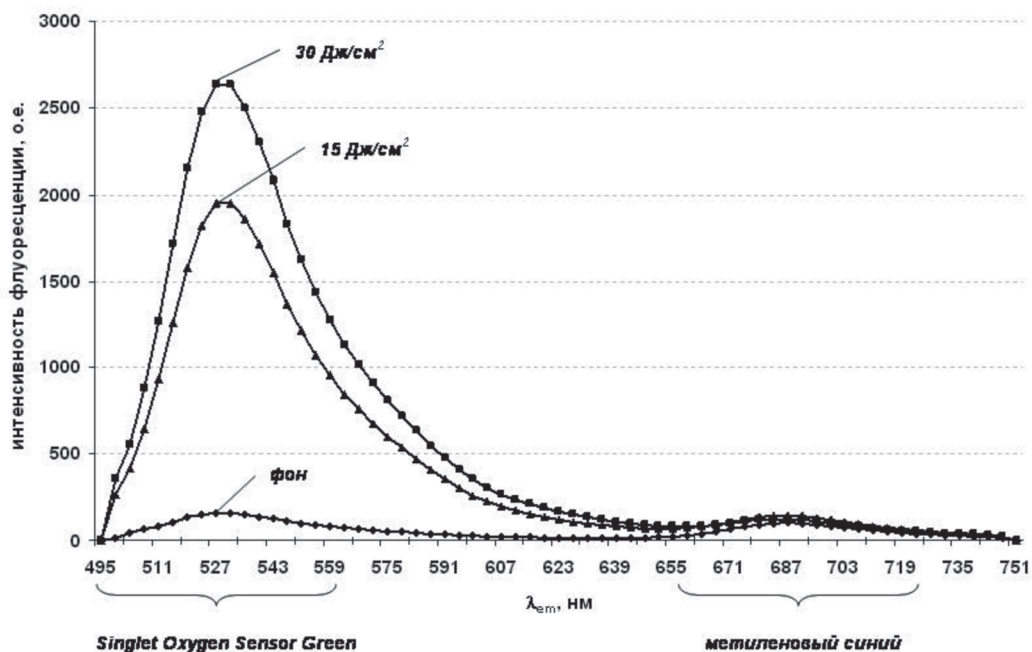


Рис. 4. Спектрофлуориметрические кривые проб десорбированного метиленового синего, облученных лазером $\lambda = 658$ нм после добавления индикатора синглетного кислорода Singlet Oxygen Sensor Green

Таблица 1

Фотобактерицидный эффект на поверхности гидрогелевого нанокompозита

Культура микроорганизмов	Жизнеспособность микроорганизмов, КОЕ/мл		
	Контрольный посев	Смывы с гидрогеля, насыщенного метиленовым синим	
		Без облучения	С облучением*
<i>Staphylococcus aureus</i>	$3,02 \pm 0,21 \times 10^4$	$5,20 \pm 0,35 \times 10^3$	$1,20 \pm 0,10 \times 10^3$
	P<0,01	P<0,01	
<i>Escherichia coli</i>	$2,22 \pm 0,12 \times 10^4$	$10,25 \pm 0,35 \times 10^3$	$1,65 \pm 0,15 \times 10^3$
	P<0,01	P<0,01	

* Доза облучения для *S. aureus* – 15 Дж/см², для *E. coli* – 30 Дж/см²

контрольными посевами, и в 25 раз – после облучения, а для *Escherichia coli*, соответственно, более чем в 2 раза и в 13,5 раз – после облучения (табл. 1).

Важно отметить, что на поверхности гидрогелевого нанокompозита с метиленовым синим

после термоиницированной диффузии создавались условия для фотобактерицидного эффекта в отношении не только грамположительных (*Staphylococcus aureus*), но и грамотрицательных (*Escherichia coli*) микроорганизмов, хотя в последнем случае для преодоления гидрофобной

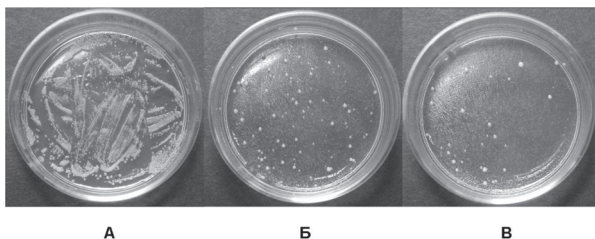


Рис. 5. Рост колоний *Staphylococcus aureus* через 24 ч после посева ~800 КОЕ:

А – исходная суспензия; Б – смыв с насыщенного метиленовым синим гидрогеля без облучения; В – смыв с насыщенного метиленовым синим гидрогеля после облучения лазером $\lambda = 658$ нм в дозе 15 Дж/см²

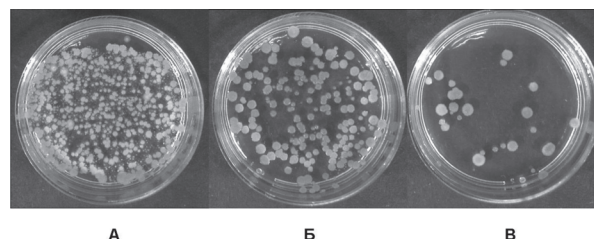


Рис. 6. Рост колоний *Escherichia coli* через 24 ч после посева ~800 КОЕ:

А – исходная суспензия; Б – смыв с насыщенного метиленовым синим гидрогеля без облучения; В – смыв с насыщенного метиленовым синим гидрогеля после облучения лазером $\lambda = 658$ нм в дозе 30 Дж/см²

оболочки потребується значительно более высокая концентрация молекул фенотиазинового фотосенсибилизатора в растворе [11, 12]. Очевидно, соотношение мономерных форм и молекулярных агрегатов десорбированного метиленового синего создавало условия как для эффективного контакта с бактериальными клетками, так и для генерации синглетного кислорода.

Выводы

Таким образом, синтезированный нами гидрогелевый нанокompозит может быть предложен в качестве системы доставки метиленового синего, обеспечивающей его высвобождение при температуре тела человека, что повысит эффективность проведения антибактериальной фотодинамической терапии.

Литература

- Blazquez-Castro A. Differential photodynamic response of cultured cells to methylene blue and toluidine blue: role of dark redox processes / A. Blazquez-Castro, J.C. Stockert, F. Sanz-Rodriguez, A. Zamarron, A. Juarranz // Photochem. Photobiol. Sci. – 2009. – Vol. 8. – P. 371–376.
- Li P. Poly(acrylamide/laponite) nanocomposite hydrogels: swelling and cationic dye adsorption properties / P. Li, Siddaramaiah, G.-H. Yoo, J.-H. Lee // J. Appl. Polym. Sci. – 2009. – Vol. 111. – P. 1786–1798.
- Nuñez S.C. Urea enhances the photodynamic efficiency of methylene blue / S.C. Nuñez, T.M. Yoshimura, M.S. Ribeiro, et al. // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. – 2015. – <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.03.018>
- Plate N.A. Lower critical solution temperature in aqueous solutions of N-alkyl-substituted polyacrylamides / N.A. Plate, T.L. Lebedeva, L.I. Valuev // Polymer J. – 1999. – Vol. 31. – P. 21–27.
- Samchenko Yu. Multipurpose smart hydrogel systems / Yu Samchenko, Z. Ulberg, O. Korotych // Adv. Colloid Interface Sci. – 2011. – Vol. 168. – P. 247–262.
- Seong D.-Y. Enhanced photodynamic therapy efficacy of methylene blue-loaded calcium phosphate nanoparticles / D.-Y. Seong, Y.-J. Kim // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. – 2015. – Vol. 146. – P. 34–43.
- Shah N. Formulation and development of hydrogel for poly acrylamide-co-acrylic acid / N. Shah, K.R. Pate // JPSBR. – 2014. – Vol. 4, No. 1. – P. 114–120.
- Spizzirri U.G. Innovative antioxidant thermo-responsive hydrogels by radical grafting of catechin on inulin chain / U.G. Spizzirri, I. Altimari, F. Puoci, et al. // Carbohydrate Polymers. – 2011. – Vol. 84. – P. 517–523.
- Tang W. Encapsulation of methylene blue in polyacrylamide nanoparticle platforms protects its photodynamic effectiveness / W. Tang, H. Xu, E.J. Park, M.A. Philbert, R. Kopelman // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2008. – Vol. 369, No 2. – P. 579–583.
- Tardivo J.P. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications / J.P. Tardivo, A. Del Giglio, C.S. de Oliveira et al. // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2005. – Vol. 2. – P. 175–191.
- Usacheva M.N. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms / M.N. Usacheva, M.C. Teichert, M.A. Biel // Lasers in Surgery and Medicine. – 2001. – Vol. 29. – P. 165–173.
- Usacheva M.N. The interaction of lipopolysaccharides with phenothiazine dyes / M.N. Usacheva, M.C. Teichert, M.A. Biel // Lasers in Surgery and Medicine. – 2003. – Vol. 33. – P. 311–319.
- Usacheva M.N. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria / M.N. Usacheva, M.C. Teichert, M.A. Biel // J. Photochem. Photobiol. B: Biology. – 2003. – Vol. 71. – P. 87–98.
- Wainwright M. Photodynamic medicine and infection control / Mark Wainwright // J. Antimicrob. Chemother. – 2012. – Vol. 67. – P. 787–788.

ФОТОБАКТЕРИЦИДНІ ВЛАСТИВОСТІ ТЕРМОЧУТЛИВОГО ГІДРОГЕЛЕВОГО НАНОКОМПОЗИТУ З МЕТИЛЕНОВИМ СИНІМ

Долинський Г.А., *Самченко Ю.М., *Пасмурцева Н.О.,
*Полторацька Т.П., *Ульберг З.Р., Кіслухіна М.О., Гамалія М.Ф.
Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
імені Р.Є. Кавецького НАН України,
03022 Україна, м. Київ, вул. Васильківська, 45,
тел.: +38(044)258-16-58, e-mail: gudy@yandex.ua
*Інститут біологічної хімії імені Ф.Д. Овчаренка НАН України,
03680 Україна, м. Київ, бульвар Вернадського, 42,
тел.: +38(063)393-72-88, e-mail: yu1sam@yahoo.com

Синтезовано гідрогелевий нанокompозит, який при нагріванні до температури тіла людини вивільняє у розчин сорбований метиленовий синій, зберігаючи його фотосенсибілізуючу активність. Змиви з поверхні гідрогелю, інкубованого впродовж доби при 37 °C з культурами *Staphylococcus aureus* і *Escherichia coli*, після опромінення лазером $\lambda = 658$ нм в дозі 15 Дж/см² і 30 Дж/см², відповідно, були вивчені методом бактеріологічного посіву на м'ясо-пептонний агар. Встановлена виражена

фотобактерицидна активність нанокompозиту з метиленовим синім як до грампозитивної, так і до грамнегативної бактеріальної культури. Зроблено висновок про перспективність його застосування в якості терморегульованої системи доставки метиленового синього до вогнища запалення для проведення антибактеріальної фотодинамічної терапії.

Ключові слова: фотобактерицидна активність, метиленовий синій, гідрогелевий нанокompозит, термоініційована дифузія.

PHOTOBACTERICIDAL PROPERTIES OF THERMOSENSITIVE HYDROGEL NANOCOMPOSITE WITH METHYLENE BLUE

*Dolynskiy G.A., *Samchenko Yu.M., *Pasmurtseva N.O.,
*Poltoratska T.P., *Ulberg Z.R., Kislukhina M.A., Gamaleia N.F.
R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NAS of Ukraine
45, Vasylykivska Str, 03022, Kyiv, Ukraine
tel.: +38(044)258-16-58, e-mail: gydy@yandex.ua
*F.D. Ovcharenko Institute of Biocolloidal Chemistry NAS of Ukraine
42, Vernadsky Blvd, 03680, Kyiv, Ukraine
tel.: +38(063)393-72-88, e-mail: yu1sam@yahoo.com*

*A hydrogel nanocomposite was synthesized, which released deposited methylene blue at temperature of human body, preserving its photosensitizing activity. The hydrogel samples were contaminated by *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* and after 24 h incubation at 37 °C irradiated with diode laser; $\lambda = 658 \text{ nm}$ at the doses of 15 J/cm^2 and 30 J/cm^2 , respectively. Swabs from the hydrogel samples surfaces were studied using CFU counts on plain agar. Evident photobactericidal activity of the nanocomposite with methylene blue was revealed, both towards gram-positive and gram-negative microorganisms. Availability of the proposed hydrogel composition exploiting as thermally controlled vehicle for methylene blue delivery to the inflammation nidus in antimicrobial photodynamic therapy was concluded.*

Keywords: photobactericidal activity, methylene blue, hydrogel nanocomposite, thermally induced diffusion.