

ФОТОДИНАМІЧНА ІНАКТИВАЦІЯ ГРАМПОЗИТИВНИХ ТА ГРАМНЕГАТИВНИХ БАКТЕРІЙ IN VITRO З ВИКОРИСТАННЯМ ФОТОСЕНСИБІЛІЗАТОРА МЕТИЛЕНОВОГО СИНЬОГО

Радченко О.С., Степура Л.Г., *Гамалія М.Ф.

ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64/13, м. Київ, 01601 Україна,
e-mail: decanat_bf@univ.kiev.ua, тел./факс: +38(044)521-35-98;

*Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р.С.Кавецького НАН України,
вул. Васильківська, 45, м. Київ, 03022 Україна,
e-mail: gamaleia@onconet.kiev.ua, тел.: +38(044)258-16-58

*Порівняна опосередкована фотосенсибілізатором метиленовим синім фотодинамічна дія лазерного випромінювання з довжиною хвилі 660 нм на грампозитивні та грамнегативні бактерії. Показано, що за щільності енергії опромінення 30,6 Дж/см² максимальна (≈ 5 lg) величина фотоінактивації клітин *Staphylococcus aureus* досягалася при концентрації метиленового синього 6-10 мкг/мл, а *Pseudomonas aeruginosa* (≈ 3 lg) - при 40 мкг/мл. За допомогою електронної мікроскопії виявлено пошкодження клітинної стінки після фотоінактивації як у грампозитивних, так і у грамнегативних бактерій з виходом клітинного вмісту та утворенням волокнистих структур.*

Ключові слова: фотосенсибілізатор метиленовий синій, лазерне випромінювання, фотоінактивація, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Вступ

Фотодинамічна інактивація (ФДІА) антибіотикорезистентних штамів патогенних мікроорганізмів - один з перспективних методів боротьби з інфекційними патологіями, що ґрунтується на антимікробній дії реактивних форм кисню: синглетного кисню і вільних радикалів, які утворюються при окисленні фотосенсибілізатора у присутності світла [7, 8, 15].

Синглетний кисень і вільні радикали діють на різні мішені у мікробній клітині, пошкоджуючи її структури та метаболічні шляхи [6]. Так, під впливом реактивних форм кисню з клітин грампозитивних і грамнегативних бактерій зникають плазмідиди й руйнуються одно- і дволанцюгові ДНК, особливо залишки гуаніну. Однак, ці ушкодження не вважаються головною причиною загибелі бактеріальної клітини, бо ДНК можуть відновлюватися її репаративними системами. Більшість фотосенсибілізаторів (ФС) мають ліпофільні властивості, тому вони, зазвичай, акумулюються на подвійному ліпідному шарі клітинних мембран. Отже, іншою мішенню дії реактивних форм кисню є цитоплазматична мембрана: її пошкодження призводить до витоку клітинного вмісту або інактивації мембранних транспортних систем, порушень синтезу клітинної стінки, до появи мультиламелярної структури по-

близу септи при поділі клітини, і до втрати клітиною іонів калію [4, 12, 14].

Через структурні відмінності у будові зовнішньої клітинної стінки грампозитивних і грамнегативних бактерій, природно, існують розбіжності в ефективності дії на них різних ФС. Клітинна стінка грампозитивних бактерій має товщину 40-80 нм і містить до 100 шарів пептидоглікану, однак вона не є ефективним бар'єром для проникнення токсичних сполук.

Навпаки, зовнішні оболонки грамнегативних бактерій з подвійним мембранним покриттям, які містять тільки 3 нм пептидогліканового шару, можуть перешкоджати дифузії ФС; це особливо стосується негативно заряджених та нейтральних речовин [5]. Тому розроблені методики подолання цього бар'єру - обробка клітин ЕДТА або поліміксином В, що роблять зовнішню стінку бактерій більш проникною і дозволяють ФС накопичуватися на цитоплазматичній мембрані [10, 13]. Оптимальним підбором ФС (хімічний склад, концентрація) і режимів опромінення (довжина хвилі, потужність) можна досягти значної інактивації (на 4-8 lg) грамнегативних бактерій *Pseudomonas aeruginosa* та *Escherichia coli* [11].

При гнійних ранових і післяопераційних полімікробних інфекціях часто виділяються

Staphylococcus aureus та *Pseudomonas aeruginosa* у поєднанні, і за певних умов вони можуть проявляти синергічний ефект [9]. Підчас фотодинамічної терапії таких патологій потрібно враховувати відмінності у динаміці ФДІА цих бактерій.

Мета роботи - порівняння ефективності ФДІА грамположитивних бактерій *Staphylococcus aureus* та грамнегативних бактерій *Pseudomonas aeruginosa* in vitro лазерним випромінюванням з довжиною хвилі 660 нм й ФС метиленовим синім в залежності від щільності енергії випромінювання та концентрації ФС. При цьому використані дані по ФДІА грамположитивних бактерій *Staphylococcus aureus*, отримані авторами раніше [2]; досліді з грамнегативними бактеріями *Pseudomonas aeruginosa* проведені знову за аналогічною методикою.

Матеріали та методи.

Об'єктом дослідження був музейний штаб *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Бактерії культивували на щільному середовищі Water Plate Count Agar (Oxoid) упродовж доби за 37°C. Робочу суспензію клітин густиною 0,4-0,6 одиниць McF (Денсіламетр II, Erba Lachema, Чехія) готували у фізіологічному розчині або фосфатному буфері (рН 7,0).

Як ФС використовували розчин метиленового синього з вихідною концентрацією 400 мкг/мл. Для його приготування фарбник розчиняли у стерильній дистильованій воді та стерилізували фільтруванням через мембранний фільтр 0,2 мкм (Parker-Domnick Hunter, США).

ФДІА бактеріальних клітин здійснювали в одноразових стерильних чашках Петрі діаметром 30 мм червоним випромінюванням напівпровідникового лазера «Ліка» («Фотоніка-плюс», м. Черкаси) з довжиною хвилі 660 нм, діючи світлом на суспензії упродовж 10, 20 та 30 хви-

лин. При щільності потужності випромінювання 25 мВт/см² ці експозиції давали щільність енергії (дозу) 15,3; 30,6 та 46 Дж/см², відповідно.

Експерименти проводили за схемою [3], модифікованою нами. Суспензія, що опромінювалася, містила 10⁹-10¹⁰ колонієутворюючих одиниць (КУО)/мл та від 0,2 до 40 мкг/мл метиленового синього. Показник КУО/мл визначали методом 10-кратних розведень з висівом 0,2 мл крайнього розведення газоном на поверхню чашки Петрі з середовищем Water Plate Count Agar (Oxoid). Культури інкубували за 37°C, результати ФДІА враховували через 24-48 годин. Контрольними були наступні зразки: контроль 1 - суспензія клітин у фізіологічному розчині без фотосенсибілізатора і без опромінення; контроль 2 - суспензія клітин у фізіологічному розчині без фотосенсибілізатора, але з опроміненням; контроль 3 - суспензія клітин у фізіологічному розчині з фотосенсибілізатором, але без опромінення. Дані експериментів наводили у вигляді десяткового логарифма показника виживання. Частку клітин, що вижили, розраховували по відношенню N_t/N_0 , де N_t - число бактерій, що вижили, а N_0 - початкова кількість бактерій, що містилася в суспензії [1].

Електронно-мікроскопічні дослідження проводили за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа JEM 1400 (Jeol, Японія) при напрузі 80 кВ та інструментальному збільшенні 600-10000. Використовували мідні сіточки (Sigma, США) з плівкою-підкладкою з формвару (Serva, Німеччина).

Результати та їх обговорення

Дані про виживання *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 in vitro після ФДІА за концентрації ФС метиленового синього 6-40 мкг/мл і щільності енергії опромінення червоним світлом 0-46 Дж/см² наведені на рис. 1. Як видно, концентрація фарбни-

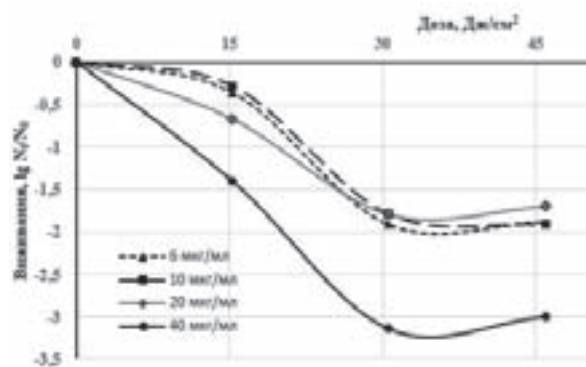


Рис. 1. Виживання *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 після ФДІА з різними концентраціями ФС та щільностями дози червоного лазерного випромінювання

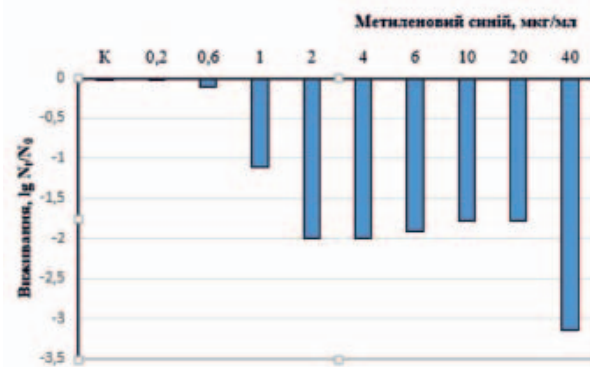


Рис. 2. Залежність виживання *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 після ФДІА від концентрації метиленового синього за щільності дози опромінення 30,6 Дж/см²

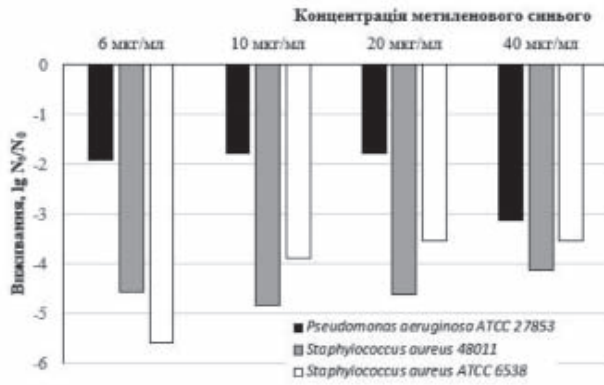


Рис. 3. Вживання бактерій *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa* після ФДІА з щільністю дози опромінення та різними концентраціями ФС

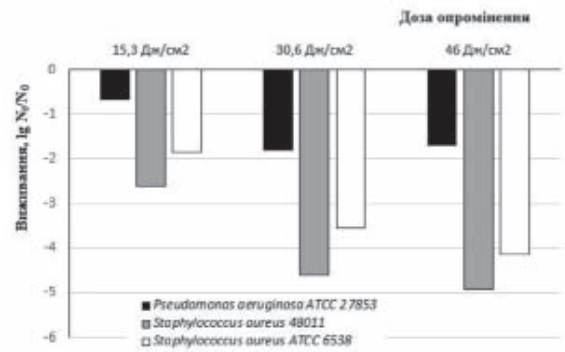


Рис. 4. Вживання бактерій *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa* після ФДІА з концентрацією ФС 20 мкг/мл та різними щільностями дози червоного лазерного випромінювання

ка у діапазоні 6-20 мкг/мл суттєво не впливала на ефективність ФДІА клітин *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Вживання клітин залежало тільки від дози опромінення. Так, при дозі 15,3 Дж/см² кількість живих клітин зменшувалося на 0,36-0,67 порядки, при 30,6 Дж/см² – на 1,8-1,9 порядки, а при 46 Дж/см² залишалася такою ж, як і при 30,6 Дж/см². Збільшення концентрації метиленового синього до 40 мкг/мл значно покращувало результат ФДІА псевдомонади: при дозі опромінення 15,3 Дж/см² кількість живих клітин зменшувалася на 1,4 порядки, а при 30,6 Дж/см² – більш як на 3 порядки. Збільшення дози опромінення до 46 Дж/см² до покращення результату не призводило. Тому, оптимальною для ФДІА *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 можна вважати дозу 30,6 Дж/см² за концентрації метиленового синього 40 мкг/мл.

Доцільність використання ФС метиленового синього у концентрації не нижче 40 мкг/мл підтверджено також результатами, наведеними на рис. 2. Як видно на ньому, збільшення концентрації фарбника з 20 до 40 мкг/мл покращувало ефективність ФДІА у 1,75 рази.

Ми порівняли фотодинамічний вплив метиленового синього та опромінення з щільністю дози 30,6 Дж/см² на грамнегативні бактерії *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 з грампозитивними штамами *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (музейний), *Staphylococcus aureus* 48011 (виділений від хворого на лейкемію мієлоїдного походження в ДУ «Інститут гематології та трансфузіології

АМН України») за аналогічними умовами ФДІА in vitro. Як видно з рис. 3, грампозитивні бактерії інактивувалися значно ефективніше, ніж грамнегативні. Так, кількість життєздатних клітин стафілококу за концентрації метиленового синього 6-10 мкг/мл зменшувалася на 4,86-5,6 порядки, а псевдомонасу навіть в присутності 40 мкг/мл фарбника - тільки на 3,14 порядки. Тобто ефективність ФДІА грамнегативних бактерій була

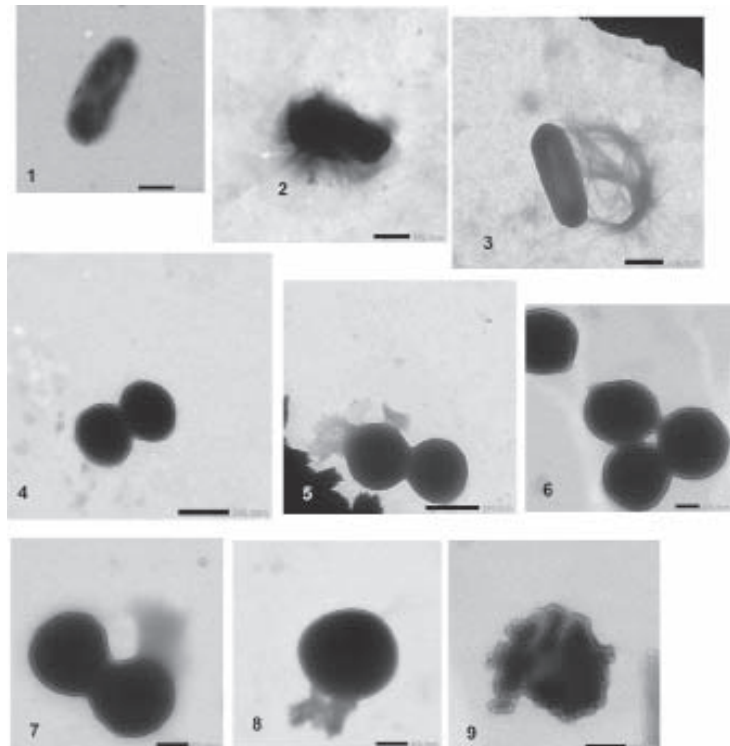


Рис. 5. Електронна мікроскопія клітин *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa* у суспензії з 10 мкг/мл ФС метиленового синього до і після лазерного опромінення з щільністю дози 30,6 Дж/см²: 1 - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 до опромінення; 2, 3 – після; 4 - *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 до опромінення; 5 – після; 6 - *Staphylococcus aureus* 48011 до опромінення; 7-9 – після.

приблизно в 100 разів менша при використанні у 4 рази більш концентрованого ФС.

При постійній концентрації метиленового синього 20 мкг/мл збільшення щільності дози опромінення з 15,3 до 30,6 Дж/см² покращувало ефективність інактивації клітин як грам-позитивних, так і грам-негативних бактерій (рис. 4). Так, виживання *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 зменшувалося на 1,12 lg; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 – на 1,69 lg; *Staphylococcus aureus* 48011 – майже на 2 lg. Подальше збільшення дози опромінення до 46 Дж/см² результат суттєво не покращувало: виживання зменшувалося на 0; 0,3 і 0,6 lg відповідно.

Було проведено електронно-мікроскопічне дослідження бактеріальних клітин, підданих ФДІА з метиленовим синім. Результати електронної мікроскопії клітин *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 та *Staphylococcus aureus* 48011 до і після ФДІА наведено на рис. 5.

Слід зазначити, що метиленовий синій без дії опромінення, а також опромінення за відсутності фотосенсибілізатора суттєво не впливали на кількість живих клітин у суспензії, тобто контролі 2 і 3 відповідали контролю 1. В різних дослідках спо-

стерігалися незначні коливання КУО/мл, які не перевищували 0,5 порядку.

Як видно з електронограм, після лазерного опромінення у присутності 10 мкг/мл ФС спостерігалось пошкодження клітинної стінки, виток вмісту клітин у навколишнє середовище та утворення волокнистих структур (можливо, білкового походження). Ці результати наших електронно-мікроскопічних досліджень, проведених на *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa*, підтверджують дані Nitzan Y. [12], отримані на *Escherichia coli*.

Висновки

Таким чином, встановлено, що чутливість клітин грам-негативної бактерії *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 до ФДІА *in vitro* з використанням метиленового синього є суттєво нижчою, ніж у штамів грам-позитивного *Staphylococcus aureus*. Якщо за щільності дози опромінення 30,6 Дж/см² і концентрації ФС 6-10 мкг/мл клітини стафілококу інактивувалися на 4,96-5,6 порядків, то за цієї ж дози і концентрації ФС 40 мкг/мл гинуло тільки 3,14 порядку клітин псевдомонади. ФДІА призводила до пошкодження клітинної стінки як грам-позитивних, так і грам-негативних бактерій з виходом клітинного вмісту назовні та утворенням волокнистих структур.

Література

1. Потапченко Н.Г. Сочетанное действие УФ-излучения ($\lambda = 254$ нм) и ионов меди и серебра на выживаемость *Escherichia coli* / Н.Г.Потапченко, О.С.Савлук, В.В.Ильяшенко // Химия и технология воды.- 1992.- Т.14, №12.- С.935-940.
2. Радченко О.С. Опосередкована метиленовим синім фотодинамічна інактивація музейного та клінічного штамів *Staphylococcus aureus* / О.С.Радченко, Л.Г.Степура, К.І.Горбенко, М.Ф.Гамалія // Фотобіологія та фотомедицина.- 2014.- №3-4.- С.92-97.
3. Alves A. Charge effect on the photoinactivation of gram-negative and gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins / A.Alves, L.Costa, C.M.B.Carvalho et al. // BMC Microbiology.- 2009.- Vol.9.- Art.70.
4. Bertoloni G. Photosensitizing activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on *Escherichia coli* / G.Bertoloni, F.Rossi, G.Valduga et al. // FEMS Microbiology Letters.- 1990.- Vol.71, №1-2.- P.149-156.
5. Phoenix D.A. The phototoxicity of phenothiazinium derivatives against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* / D.A.Phoenix, Z.Sayed, S.Hussain et al // FEMS Immunology and Medical Microbiology.- 2003.-Vol.39.- P.17-22.
6. Gueorgieva T. Susceptibility of *S. aureus* to methylene blue, haematoporphyrin, phtalocyanines photodynamic effects / T.Gueorgieva, S.Dimitrov, V.Dogandhiyska et al // Journal of IMAV.- 2010.- Vol.16, №4.- P.51-53.
7. Grinholc M. Multiresistant strains are as susceptible to photodynamic inactivation as their naive counterparts: protoporphyrin IX-mediated photoinactivation reveals differences between methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* strains / M.Grinholc, A.Rapacka-Zdonchyk, B.Rybak et al. // Photomed. Laser Surg.- 2014.- Vol.32, №3.- P.121-129.
8. Hamblin M.R. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? / M.R.Hamblin, T.Hasan // Photochemical and Photobiological Sciences.- 2004.- Vol.3, №5.- P.436-450.
9. Hendricks K.J. Synergy between *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in a rat model of complex orthopaedic wounds / K.J.Hendricks, T.A.Burd, J.O.Anglen et al. // J. Bone Joint Surg. Am.- 2001.- Vol.83A, №6.- P.855-861.
10. Maisch T. Combination of 10% EDTA, Photosan, and a blue light hand-held photopolymerizer to inactivate leading oral bacteria in dentistry *in vitro* / T.Maisch, J.Wagner, V.Papastamou et al. // J. of Applied Microbiology.- 2009.- Vol.107, №5.- P.1569-1578.
11. Melo W.C.M.A. Effectiveness of photodynamic therapy on gram-negative bacteria / W.C.M.A.Melo, L.F.Castro, R.M.M.T.S.Dal'mas // Science against microbial pathogens: communication current research and technological advances.- Formatex Research Center, Badajoz, Spain, 2011.- Vol.1.- P.662-667.
12. Nitzan Y. Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins / Y.Nitzan, M.Gutterman, Z.Malik et al // Photochemistry and Photobiology.- 1992.- Vol.55, №1.- P.89-96.

13. Vaara M. Polycations as outer membrane disorganizing agents / M.Vaara, T.Vaara // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.- 1983.- Vol.24, №1.- P.114–122.

14. Valduga G. Photosensitization of wild and mutant strains of *Escherichia coli* by meso-tetra (N-methyl-4-pyridyl) porphine / G.Valduga, B.Breda, G.M.Giacometti et al

// *Biochemical and Biophysical Research Communications*.- 1999.- Vol.256, №1.- P.84–88.

15. Fu X.-J. Antimicrobial photodynamic therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection / Xiu-jun Fu, Yong Fang, Min Yao // *BioMed Research International*.- 2013.- Vol.9.- ID 159157.

**ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ИНАКТИВАЦИЯ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ И ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ
БАКТЕРИЙ IN VITRO С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА
МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО**

*Радченко О.С., Степура Л.Г., *Гамалея Н.Ф.*

*ННЦ «Институт биологии» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко,
ул. Владимирская, 64/13, г. Киев, 01601 Украина,*

e-mail: decanat_bf@univ.kiev.ua, тел./факс: +38 (044) 521-35-98;

**Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии
имени Р.Е.Кавецкого НАН Украины,*

ул. Васильковская, 45, г. Киев, 03022 Украина,

e-mail: gamaleia@onconet.kiev.ua, тел.: +38 (044) 258-16-58

*Проведено сравнение опосредованного фотосенсибилизатором метиленовым синим фотодинамического действия лазерного излучения с длиной волны 660 нм на грамположительные и грамотрицательные бактерии. Показано, что при плотности дозы энергии облучения 30,6 Дж/см² максимальная ($\approx 5 \lg$) величина фотоинактивации клеток *Staphylococcus aureus* достигается при концентрации метиленового синего 6-10 мкг/мл, а *Pseudomonas aeruginosa* ($\approx 3 \lg$) - при 40 мкг/мл. При помощи электронной микроскопии обнаружено повреждение клеточной стенки после фотоинактивации как у грамположительных, так и у грамотрицательных бактерий с выходом клеточного содержимого и образованием волокнистых структур.*

Ключевые слова: *фотосенсибилизатор метиленовый синий, лазерное излучение, фотоинактивация, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa**

**PHOTODYNAMIC INACTIVATION OF GRAM-POSITIVE AND GRAM-NEGATIVE BACTERIA
IN VITRO WITH PHOTOSENSITIZER METHYLENE BLUE**

*O.Radchenko, L.Stepura, *Gamaleia N.*

*ESC Institute of Biology of Taras Shevchenko National University of Kyiv,
64/13, Volodymyrska Str., Kyiv, 01601 Ukraine,*

e-mail: decanat_bf@univ.kiev.ua, tel./fax: +38 (044) 521-35-98;

**R.E.Kavetsky IEPOR NAS of Ukraine,*

45, Vasylykivska Str., Kyiv, 03022 Ukraine,

e-mail: gamaleia@onconet.kiev.ua, tel.: +38 (044) 258-16-58

*The photodynamic effect of laser radiation (wave length of 660 nm), mediated by the photosensitizer methylene blue, on gram-positive and gram-negative bacteria was compared. It was shown that the radiation energy dose density of 30.6 J/cm² reduced the number of live *Staphylococcus aureus* cells maximally (by $\approx 5 \lg$) under the stain concentration 6-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The *Pseudomonas aeruginosa* cells were reduced by only $\approx 3 \lg$ under the stain concentration 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The electron microscopy investigation revealed cell wall damage in both gram-positive and gram-negative bacteria with a cell content release and fibrillary structures formation.*

Keywords: *photosensitizer methylene blue, laser radiation, photoinactivation, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.*