



УДК 619:636,22/28

**ИЗУЧЕНИЕ АКТИВАЦИИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА
ИЗЛУЧЕНИЕМ С НЕСПЕЦИФИЧНОЙ ДЛИНОЙ ВОЛНЫ**

А.В. ПАВЛОВ, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,
Е.Ю. СМЕРТИНА, доктор ветеринарных наук, заведующая лабораторией
Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СФНЦА РАН
630501, Россия, Новосибирская область, пос. Краснообск
e-mail: e.smertina2011@yandex.ru

Представлены результаты исследований одного из перспективных методов фотодинамической терапии для инактивации антибиотикорезистентных микроорганизмов. Процесс основан на облучении оптическим излучением со специфичной длиной волны фотосенсибилизаторов – веществ, способных диссоциировать при поглощении квантов, образуя при этом свободные радикалы, обладающие цитотоксическим действием. Изучена эффективность активации фотосенсибилизатора метиленового синего красителя с концентрацией водных растворов 0,02 и 0,1 % специфичным для него оптическим излучением с длиной волны 620 нм и неспецифичным излучением с длиной волны 405 нм. Для получения монохромного неполяризованного оптического излучения использованы LED-источники соответствующих волн выходной мощностью 3500 мВт. Эффективность активации растворов оценена по показаниям аналогового осциллографа, регистрировавшего напряжение на электродах, погруженных в раствор фотосенсибилизатора. Измерения в опыте проведены с интервалом в 30 с до достижения максимальных значений напряжений на электродах и внесения органического вещества (мясопептонный агар). Установлена стойкая активация фотосенсибилизатора специфичным для него излучением (620 нм) в отличие от излучения 405 нм, эффект от которого выражен непосредственно во время облучения. Обнаружена зависимость активации фотосенсибилизатора от концентрации раствора – эффективность 0,02%-го раствора метиленового синего красителя выше 0,1%-го, что можно объяснить меньшей оптической плотностью первого. Внесение органического вещества сопровождается резким увеличением напряжения на электродах. Оптическое излучение с длиной волны 405 нм, являющееся неспецифичным для фотосенсибилизатора метиленового синего красителя, может быть использовано для его активации.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, метиленовый синий краситель, оптическое излучение, свободные радикалы, электрический потенциал.

Широкое распространение антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов вызывает необходимость поиска и разработки новых методов терапии.

Фотодинамическая терапия, основанная на облучении фотосенсибилизаторов – веществ, способных диссоциировать при поглощении квантов оптического излучения со специфичной длиной волны, образуя при этом свободные радикалы, обладающие ци-

тотоксическим действием, – один из успешных методов диагностики и лечения злокачественных новообразований [1–5]. Этот метод является платформой для разработки новых способов инактивации антибиотикорезистентных микроорганизмов, в основе которых лежит свойство фотосенсибилизаторов накапливаться в патологически измененных клетках организма и высвобождать под воздействием оптического излучения

свободные радикалы, которые реагируют с внутриклеточными компонентами и, следовательно, производят инактивацию клеток [6, 7].

В литературе опубликованы исследования по изучению воздействия фотосенсибилизаторов с последующим облучением на условно-патогенные микроорганизмы. Установлена инаktivация клеток *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* в результате воздействия фталоциановых соединений цинка в качестве фотосенсибилизатора и последующей обработки лазерным излучением мощностью 50 мВт, с длиной волны 1,5 мкм и экспозицией 10 мин [8]. Подтверждено антимикробное действие 0,02%-го раствора метиленового синего красителя на культуру *Staphylococcus aureus* при воздействии оптического излучения с длиной волны 620 нм [9]. Эффективна терапия кандидоза полости рта, вызванного антибиотикорезистентным штаммом *Candida albicans* с применением в качестве фотосенсибилизатора метиленового синего красителя и кадмий-галлий-фосфидного лазера с длиной волны 620 нм и экспозицией 5 мин [10]. Успешная инаktivация этих же микроорганизмов с помощью фталоцианового ацетата лютеция как фотосенсибилизатора и светодиодного излучения с длиной волны 665 нм [11]. Интерес представляют результаты по инаktivации метициллин-резистентных штаммов *Staphylococcus aureus* (MRSA) с применением метиленового синего красителя и лазерного излучения с длиной волны 665 нм, толуидинового голубого красителя и излучения гелий-неонового лазера с длиной волны 632,8 нм [12, 13]. Наиболее интересными являются результаты, свидетельствующие об инаktivации клеток антибиотикорезистентного штамма *Candida albicans* интенсивным голубым светом (400–470 нм, 35 Дж/см²), в отсутствии фотосенсибилизатора. Автор объясняет полученные данные наличием естественных внутриклеточных фотосенсибилизаторов – порфиринов и флавинов [14]. Установлено бактерицидное действие интенсивного голубого света в отношении MRSA без применения фотосенсибилизаторов, которое автор объясняет

возбуждением эндогенных порфиринов и флавинов в клетках микроорганизмов и которые отсутствуют в клетках хозяев [15].

Совместное использование оптического излучения с длиной волны 400–470 нм (голубого), способного возбуждать внутриклеточные порфирины и флавины с фотосенсибилизатором, обладающим свойством инаktivировать антибиотикорезистентные микроорганизмы, представляет значительный интерес.

Цель исследования – изучение активации метиленового синего красителя оптическим излучением с длиной волны 620 нм и неспецифичным для красителя излучением с длиной волны 405 нм.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проведены в лаборатории воспроизводства и адаптации сельскохозяйственных животных Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока Сибирского федерального научного центра агробiotехнологий Российской академии наук. В работе использовали 0,02 и 0,1%-е растворы метиленового синего красителя в дистиллированной воде, имеющие спектр поглощения оптического излучения в диапазоне 618–668 нм, два пластинчатых электрода, изготовленных из OFC-меди (бескислородной) с площадью погружаемой поверхности 1260 мм² каждый, аналоговый осциллограф GW Instek GOS-6051 в режиме измерения постоянного напряжения. Использовались специально разработанные LED-облучатели с длинами волн 620 и 405 нм выходной мощностью 3500 мВт каждый. После включения облучателя регистрировали показания на экране осциллографа каждые 30 с. Для инициирования выделения свободных радикалов в раствор фотосенсибилизатора после облучения вносили навеску мясopептoнного агарa (МПА) массой 0,5 г. Математическую обработку полученных результатов проводили с помощью Microsoft Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ данных исследований показывает эффективность активации фотосенсибилизатора от его концентрации и длины волны оптического облучения (см. таблицу).

До облучения раствора метиленового синего красителя на электродах, помещенных в него, отсутствует электрический потенциал. Воздействие на раствор фотосенсибилизатора оптического излучения сопровождается появлением электрического напряжения, которое через 9 мин достигает своего максимума и составляет 4,5 и 4,3 мВ в растворе с концентрацией 0,02 % (облучение с длиной волны 620 и 405 нм соответственно). В растворе с концентрацией фотосенсибилизатора

ра 0,1 % потенциал на электродах достигает 4,0 и 2,0 мВ (облучение с длиной волны 620 и 405 нм соответственно), что свидетельствует об образовании в растворе частиц с разноименными электрическими зарядами (ионов, свободных радикалов), вызывающих поляризацию электродов. При отключении оптического излучения с длиной волны 620 нм потенциал напряжения на медных электродах (в растворах фотосенсибилизатора с концентрацией 0,02 и 0,1 %) сохраняется в течение последующего времени наблюдения – 5 мин. При отключении оптического излучения с длиной волны 405 нм, электрический потенциал на электродах (в растворе с концентрацией фотосенсибилизатора 0,02 %) уменьшается до 1,5 мВ в течение 2 с и до 0,2 мВ (в растворе с концентрацией фото-

Изменение напряжения на электродах в растворах фотосенсибилизатора разной концентрации при различном оптическом облучении, мВ

Время от начала опыта (мин)	Концентрация раствора фотосенсибилизатора			
	0,02%-я		0,1%-я	
	длина волны, нм			
	620	405	620	405
0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,5	0,3	4,0	0,0	1,0
1,0	0,7	4,0	0,25	1,25
1,5	1,1	4,0	0,25	1,3
2,0	1,5	4,0	0,5	1,35
2,5	1,8	4,0	0,75	1,4
3,0	2,1	4,0	1,0	1,45
3,5	2,4	4,1	1,05	1,5
4,0	2,7	4,1	1,1	1,55
4,5	3,0	4,1	1,2	1,6
5,0	3,25	4,15	1,3	1,65
5,5	3,5	4,15	1,4	1,7
6,0	3,75	4,15	1,5	1,75
6,5	4,1	4,2	2,0	1,8
7,0	4,35	4,2	2,5	1,85
7,5	4,5	4,2	3,0	1,9
8,0	4,5	4,25	3,5	2,0
8,5	4,5	4,25	4,0	2,0
9,0	4,5	4,3	4,0	2,0
9,5	4,5	4,3	4,0	2,0
10,0	4,5	4,3	4,0	2,0
При отключении облучения	4,5	1,5	4,0	0,2
При внесении МПА	40,0	17,0	9,0	3,0

сенсибилизатора 0,1 %) и удерживается на этом значении 5 мин.

Внесение в облучаемый раствор органического вещества (навеска МПА массой 0,5 г) сопровождается увеличением напряжения на электродах до 40,0; 17,0; 9,0; 3,0 мВ во всех группах соответственно. Данное наблюдение свидетельствует о выделении свободных радикалов органическим веществом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Воздействие на растворы фотосенсибилизатора специфичным для него оптическим излучением с длиной волны 620 нм и неспецифичным излучением с длиной волны 405 нм сопровождается появлением напряжения на электродах, что свидетельствует о его активации как средства воздействия на условно-патогенные микроорганизмы.

Оптическое излучение, лежащее в спектре поглощения фотосенсибилизатора (620 нм), вызывает его стойкую активацию в отличие от другого излучения (405 нм), эффект от которого выражен непосредственно во время облучения. Концентрация раствора фотосенсибилизатора оказывает непосредственное влияние на эффективность активации; так, в 0,02%-м растворе метиленового синего красителя описанные эффекты более выражены, чем в 0,1%-м, что можно объяснить меньшей оптической плотностью первого. Внесение органического вещества (МПА) сопровождается резким увеличением напряжения на электродах. Можно предположить, что активация фотосенсибилизатора *in vitro* протекает в две стадии:

– возбуждения молекул фотосенсибилизатора путем сообщения им дополнительной энергии оптическим излучением;

– взаимодействия возбужденных молекул фотосенсибилизатора с органическим веществом, сопровождающегося интенсивным выделением свободных радикалов и поляризацией медных электродов соответственно.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Розенкранц А.А., Сластникова Т.А., Дурманов М.О., Соболев А.С. Меланокортиновые

рецепторы первого типа и меланома // Биохимия. – 2013. – Т. 78, вып. 11, – С. 1564–1575.

2. Azais H., Mordon S., Collinet P. Intraperitoneal photodynamic therapy for peritoneal metastasis of epithelial ovarian cancer // Limits and future prospects. Gynecol. Obstet. Fertil. Senol. – 2017. – N 31. – P. 2468–2475.
3. Estevez J., Ascencio M., Colin P. Continuous or fractionated photodynamic therapy? Comparison of three PDT schemes for ovarian peritoneal micrometastasis treatment in a rat model// Photodiagnosis Photodyn Ther. – 2010. – N 7 (4). – P. 251–257.
4. Guyon L., Ascencio M., Collinet P., Mordon S. Photodiagnosis and photodynamic therapy of peritoneal metastasis of ovarian cancer // Photodiagnosis Photodyn Ther. – 2012. – N 9 (1). – P. 16–31.
5. Rizvi I., Anbil S., Alagic N. PDT dose parameters impact tumoricidal durability and cell death pathways in a 3D ovarian cancer model // Photochem Photobiol. – 2013. – N 89 (4). – P. 942–952.
6. Denis T., Dai T., Izikson L. All you need is light: antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease // Virulence. – 2011. – N 2 (6). – P. 509–520.
7. Hamblin M. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes // Curr Opin Microbiol. – 2016. – N 33. – P. 67–73.
8. 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.
9. 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.
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. – N 24 (2). – P. 188–192.
11. Mantareva V., Kussovski V., Durmue M. et al. Photodynamic inactivation of pathogenic species *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* with lutetium (III) acetate phthalocyanines and

- specific light irradiation// *Lasers Med Sci.* – 2016. – N 31(8). – P. 1591–1598.
12. **Hajim K., Salih D.S., Rassam Y.Z.** Laser light combined with a photosensitizer may eliminate methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* // *Lasers Med Sci.* – 2010. – P. 743–748.
 13. **Tubby S., Wilson M., Nair S.** Inactivation of staphylococcal virulence factors using a light-activated antimicrobial agent // *BMC Microbiol.* – 2009. – N 5 (9). – P. 211–219.
 14. **Durantini E.** New insights into the antimicrobial blue light inactivation of *Candida albicans* // *Virulence.* – 2016. – N 7 (5). – P. 493–497.
 15. **Agrawal T., Avci P., Gupta G.K., Rineh A., Lakshmanan S.** Harnessing the power of light to treat staphylococcal infections focusing on MRSA // *Curr Pharm* – 2015. – N 21 (16). – P. 2109–2121.
- REFERENCES**
1. **Rozenkrants A.A., Slastnikova T.A., Durymanov M.O., Sobolev A.S.** Melanokortinovyie retseptory pervogo tipa i melanoma // *Biokhimiya.* – 2013. – T. 78, vyp. 11, – S. 1564–1575.
 2. **Azais H., Mordon S., Collinet P.** Intraperitoneal photodynamic therapy for peritoneal metastasis of epithelial ovarian cancer // *Limits and future prospects. Gynecol. Obstet. Fertil. Senol.* – 2017. – N 31. – P. 2468–2475.
 3. **Estevez J., Ascencio M., Colin P.** Continuous or fractionated photodynamic therapy? Comparison of three PDT schemes for ovarian peritoneal micrometastasis treatment in a rat model // *Photodiagnosis Photodyn Ther.* – 2010. – N 7 (4). – P. 251–257.
 4. **Guyon L., Ascencio M., Collinet P., Mordon S.** Photodiagnosis and photodynamic therapy of peritoneal metastasis of ovarian cancer // *Photodiagnosis Photodyn Ther.* – 2012. – N 9 (1). – P. 16–31.
 5. **Rizvi I., Anbil S., Alagic N.** PDT dose parameters impact tumoricidal durability and cell death pathways in a 3D ovarian cancer model // *Photochem Photobiol.* – 2013. – N 89(4). – P. 942–952.
 6. **Denis T., Dai T., Izikson L.** All you need is light: antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease // *Virulence.* – 2011. – N 2(6). – P. 509–520.
 7. **Hamblin M.** Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes // *Curr Opin Microbiol.* – 2016. – N 3. – P. 67–73.
 8. **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.
 9. **Pavlov A.V., Smertina E.Yu., Donchenko N.A.** Antimikrobnoe deistvie fotosensibilizatora metilenovogo sinego na kul'turu *Staphylococcus aureus* // *Sib. vestn. s-kh nauki.* – 2013. – № 3. – S. 91–94.
 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. – N 24 (2). – P. 188–192.
 11. **Mantareva V., Kussovski V., Durmue M. et al.** Photodynamic inactivation of pathogenic species *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* with lutetium (III) acetate phthalocyanines and specific light irradiation// *Lasers Med Sci.* – 2016. – N 31(8). – P. 1591–1598.
 12. **Hajim K., Salih D.S., Rassam Y.Z.** Laser light combined with a photosensitizer may eliminate methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* // *Lasers Med Sci.* – 2010. – P. 743–748.
 13. **Tubby S., Wilson M., Nair S.** Inactivation of staphylococcal virulence factors using a light-activated antimicrobial agent // *BMC Microbiol.* – 2009. – N 5, 9. – P. 211–219.
 14. **Durantini E.** New insights into the antimicrobial blue light inactivation of *Candida albicans* // *Virulence.* – 2016. – N 7(5). – P. 493–497.
 15. **Agrawal T., Avci P., Gupta G.K., Rineh A., Lakshmanan S.** Harnessing the power of light to treat staphylococcal infections focusing on MRSA // *Curr Pharm* – 2015. – N 21(16). – P. 2109–2121.

STUDYING ACTIVATION OF A PHOTSENSITIZER BY RADIATION WITH NON-SPECIFIC WAVELENGTH

**A.V. PAVLOV, Candidate of Science in Biology, Senior Researcher,
E.YU. SMERTINA, Doctor of Science in Veterinary Medicine, Laboratory Head**
Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East, SFSCA RAS
Krasnoobsk, Novosibirsk Region, 630501, Russia
e-mail: e.smertina2011@yandex.ru

Results are given from studies in the field of photodynamic therapy on diagnosing and treating malignant neoplasms. There was studied the efficiency of activation of 0.02% and 0.1% methylene blue solutions by specific optical radiation with the wavelength of 620 nm and nonspecific optical radiation with the wavelength of 405 nm. We used LED sources of monochrome unpolarized optical radiation with wavelengths of 620 nm and 405 nm and output power of 3,500 milliwatts each. The efficiency of solution activation was evaluated by voltage on copper electrodes immersed in the photosensitizer solution, which was measured by an analog oscilloscope. The indices were recorded every 30 seconds until the maximum voltage on the electrodes was reached, then 0.5 g of organic matter (meat peptone agar) was added to the activated photosensitizer solution. Optical radiation with the wavelength of 620 nm was found to cause the stable activation of the photosensitizer, in contrast to radiation with the wavelength of 405 nm, the effect of which was expressed directly during irradiation. The concentration of the photosensitizer solution had a direct effect on the activation efficiency; so, the activation in 0.2% methylene blue solution was more pronounced than that in 0.1%, which can be explained by lower optical density of the former. The introduction of organic matter was accompanied by a sharp increase in the voltage at the electrodes. Thus, optical radiation with the wavelength of 405 nm, which is nonspecific for methylene blue as a photosensitizing dye, can be used to activate it.

Keywords: photodynamic therapy, methylene blue dye, optical radiation, free radicals, electric potential.

Поступила в редакцию 05.05.2017
