

ID: 2012-06-1003-A-1579

Оригинальная статья

Тучина Е.С., Петров П.О.

Оценка антибактериальной активности двух модификаций индоцианинового зеленого при воздействии лазерного инфракрасного (808 нм) излучения

ФГБОУ ВПО Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского

Резюме

В работе рассматривается чувствительность трех представителей рода *Staphylococcus* к комплексному действию лазерного инфракрасного (808 нм) излучения и двух модификаций красителя индоцианинового зеленого.

Ключевые слова: лазерное излучение, индоцианиновый зеленый, стафилококки

Введение

Краситель индоцианиновый зеленый активно используется в самых различных областях медицины: онкологии, офтальмологии, кардиологии, хирургии, дерматологии, в косметологии. Важным является также очень низкая токсичность и быстрое выведение данного красителя из организма [1,2].

Индоцианиновый зеленый является перспективным красителем для применения в фотодинамической терапии, поскольку его максимум поглощения находится в пределах от 780 до 850 нм, что соответствует максимуму испускания инфракрасных лазеров [3].

Механизм угнетающего действия индоцианинового зеленого не достаточно изучен. По мнению разных авторов, данный краситель обладает достаточно сильным фототоксическим действием, что можно отнести за счет его фотодинамического эффекта [2-5] или образования цитотоксических конечных продуктов под действием света [6].

Представляло интерес оценить антимикробную эффективность двух модификаций индоцианинового зеленого при воздействии лазерного инфракрасного (808 нм) излучения на стафилококки.

Материалы и методы

В работе использовали две модификации красителя индоцианина зеленого (Sigma-Aldrich Co., USA) с максимумами поглощения на длинах волн 775 нм (ИЗ-775) и 800 нм (ИЗ-800) соответственно. Для экспериментов были выбраны концентрации красителей 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1%.

В качестве модельных микроорганизмов были выбраны: *Staphylococcus aureus* 209P, *S.epidermidis* (метициллин-чувствительный (MS) и метициллин-устойчивый (MR) штаммы). Микроорганизмы были получены из коллекции Государственного Института Стандартизации и Контроля им. Л.А. Тарасевича и Саратовского государственного медицинского университета. Бактерии выращивали при температуре 37 °С на универсальной плотной питательной среде (ГРМ-агар, Оболенск, Россия).

В качестве источника инфракрасного излучения применяли диодный лазер с максимумом спектра испускания $\lambda=808\pm 15$ нм, плотностью мощности излучения – 60 мВт/см². Во всех экспериментах использовали непрерывный режим излучения. Время облучения составляло от 5 до 30 мин.

Бактериальную взвесь готовили в стерильном физиологическом растворе до конечной концентрации 10³ мк/мл. Из разведения микроорганизмов 10⁵ мк/мл 0.1 мл взвеси вносили в 0.9 мл раствора красителя, инкубировали в течение 15 мин без доступа света. Из конечного разведения, а также из раствора фотосенсибилизатора бактериальную взвесь в объеме 0.1 мл вносили в ячейки планшета.

Источник излучения располагали над ячейками планшета; воздействие проводили последовательно увеличивая время облучения. После воздействия взвеси бактерий переносили на чашки Петри с плотной питательной средой и равномерно распределяли по поверхности стерильным шпателем. Учет результатов проводили путем подсчета числа колониеобразующих единиц (КОЕ) через 24 – 72 часа после инкубации при 37°С. Контролем служили взвеси бактерий не обработанные сенсибилизатором и не подвергнутые облучению.

Результаты

На первом этапе исследований оценивали чувствительность модельных микроорганизмов к действию различных концентраций ИЗ-775 и ИЗ-800 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1% по изменению числа КОЕ (табл. 1).

Таблица 1. Действие различных концентраций индоцианинового зеленого на число КОЕ стафилококков, %

Вид бактерий	Контроль (физ. р.-р.)	ИЗ-800, %				ИЗ-775, %			
		0.0001	0.001	0.01	0.1	0.0001	0.001	0.01	0.1
<i>S. aureus</i>	99.06± 3.24	97.61± 2.39	62.14± 4.96	42.03± 3.62	28.24± 2.76	99.55± 2.49	95.70± 2.17	62.03± 3.12	58.24± 4.72
<i>S. epidermidis MS</i>	98.98± 2.12	93.52± 2.49	65.70± 4.17	35.71± 3.41	26.03± 4.47	97.43± 2.37	98.09± 3.10	45.71± 3.21	66.03± 3.43
<i>S. epidermidis MR</i>	99.12± 2.21	95.55± 3.45	60.09± 4.12	33.72± 4.92	25.71± 4.25	98.41± 2.42	97.45± 2.52	65.72± 3.92	65.71± 3.21

Установлено, что оптимальными концентрациями используемых веществ, которые вызывают наименьшую гибель микроорганизмов, являются 0.001% для ИЗ-775 и 0.0001% для ИЗ-800.

Исходя из полученных данных, на следующем этапе работы использовали длительность предварительной инкубации бактериальных клеток с наночастицами, равную 15 мин, экспозицию излучения 5, 10, 15 и 30 мин. В качестве фотосенсибилизаторов использовали две модификации индоцианина зеленого: ИЗ-775 с концентрацией 0.001%, ИЗ-800 с концентрацией 0.0001%.

Установлено, что инфракрасное лазерное излучение незначительно подавляет рост микроорганизмов. Для всех исследованных штаммов снижение числа КОЕ отмечено в пределах от 10 до 35% при варьировании времени облучения от 5 до 30 мин.

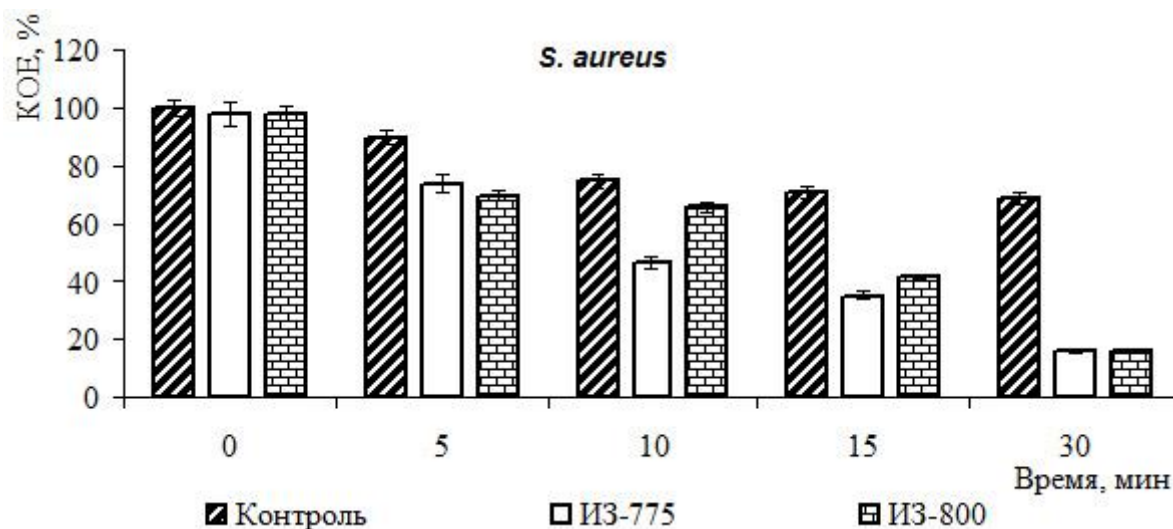


Рис. 1. Изменение численности *S. aureus* 209 P при воздействии лазерным инфракрасным (808 нм) излучением

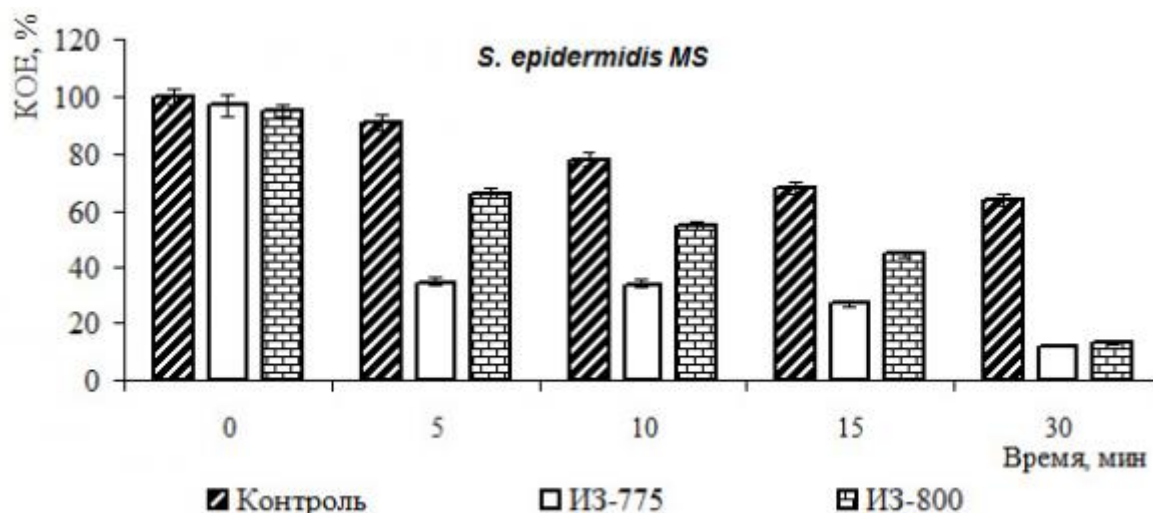


Рис. 2. Изменение численности *S. epidermidis* MS при воздействии лазерным инфракрасным (808 нм) излучением

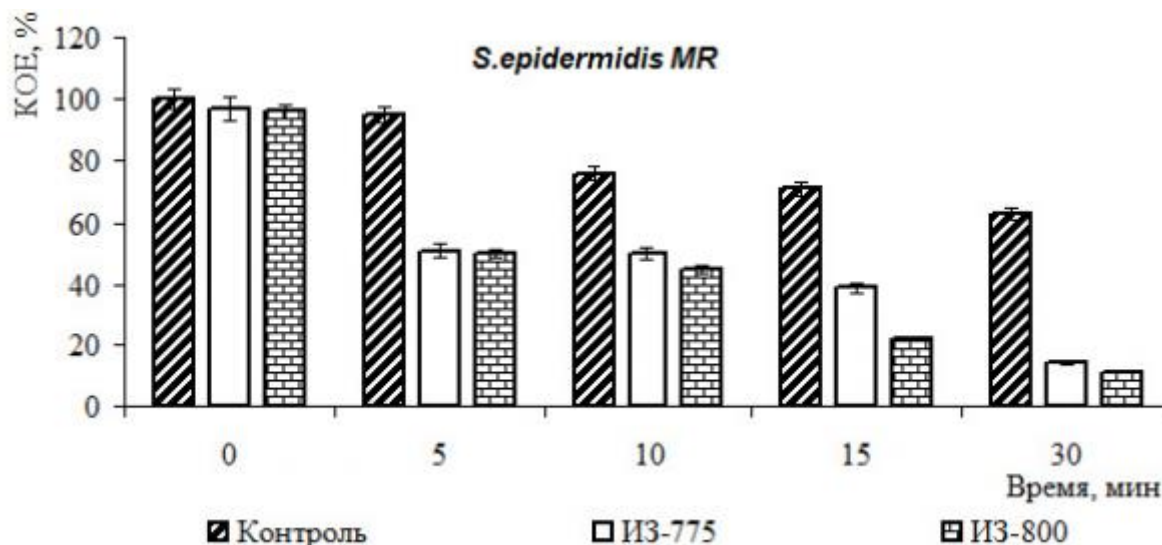


Рис. 3. Изменение численности *S. epidermidis* MR при воздействии лазерным инфракрасным (808 нм) излучением

Сходный характер подавления роста микроорганизмов ИК-излучением в сочетании с обработкой клеток ИЗ-775 отмечен для *S. aureus* 209 P и *S. epidermidis* MS (рис. 1, 2). Уменьшение показателя КОЕ происходило примерно на 40 – 85%. Метициллин-устойчивый штамм эпидермального стафилококка был более подвержен фотодинамическому воздействию ИК-излучения и красителя ИЗ-775. Сокращение числа КОЕ показано на 65 – 87% по сравнению с контролем (рис. 3).

Наибольшую устойчивость к воздействию ИК-излучения в сочетании с красителем ИЗ-800 продемонстрировал *S. aureus* 209 P (рис. 1). Снижение показателя КОЕ по сравнению с контролем отмечено на 30 – 65%. Для двух штаммов *S. epidermidis* была установлена сходная тенденция в чувствительности к фотодинамическому воздействию ИК-излучения и красителя ИЗ-800. Сокращение числа КОЕ выявлено на 40 – 87% (рис. 2, 3).

Таким образом, использованные в работе модификации индоцианина зеленого являются эффективными фотосенсибилизаторами при фотодинамическом воздействии инфракрасного лазерного излучения с длиной волны 808 нм на стафилококки. При малой длительности облучения (5-10 мин) большей подавляющей способностью обладал индоцианин зеленый с длиной волны 775 нм. Сокращение численности бактерий, обработанных как ИЗ-775, так и ИЗ-800, после 30 мин воздействия инфракрасного лазерного излучения имело сходный уровень для всех исследованных штаммов (в среднем 85%).

Литература

1. Abels C., Fickweiler S., Weiderer P., Baumler W., Indocyanine green and laser irradiation induce photooxidation // Arch. Dermatol. Res. – 2000 – V. 292. – P. 404-411.
2. Fickweiler S., Rolf-Markus Szeimies R.-M., Baumler W., Steinbach P., Karrer S., Goetz A.E., Abels C., Hofstaidter F., Landthaler M. Indocyanine green: Intracellular uptake and phototherapeutic effects in vitro // J. Photochem. Photobiol. B. – 1997. – V. 38. – P. 178-183.
3. Baumler W., Abels C., Karrer S., Weiss T., Messmann H., Landthaler M., Szeimies R.M. Photo-oxidative killing of human colonic cancer cells using indocyanine green and infrared light. // Br. J. Cancer. – 1999. – V. 80. – P. 360-363.
4. Urbanska K., Romanowska-Dixon B., Matuszak Z., Oszejca J., Nowak-Sliwinska P., Stoch G., Indocyanine green as a prospective sensitizer for photodynamic therapy of melanomas // Acta Biochimica Polon. – 2000. – V. 49. – № 2. – P. 387-391.
5. Xu R.X., Huang J., Xu J.S., Sun D., Hinkle G.H., Martin E.W., Povoski S.P. Fabrication of indocyanine green encapsulated biodegradable microbubbles for structural and functional imaging of cancer. // J. Biomed. Opt. – 2009. – V.14. – № 3. P.034020-034026.
6. Engel E., Schraml R., Maisch T., Kobuch K., König B., Szeimies R.-M., Hillenkamp J., Bäuml W., Vasold R. Light-Induced Decomposition of Indocyanine Green // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2008. – V.49. – № 5. – P.1777-1783.