

DETERMINATION OF INDIVIDUAL RISK OF DEVELOPMENT OF BILATERAL RHEGMATOGENIC
RETINAL DETACHMENT AND ITS RECCURENCES

D. A. Chichur, I. F. Ilyinskaja

Kiev, Ukraine

In our work we suggest criterions that refer to the groups of risk of possible recurrent retinal detachment and bilateral retinal detachment as well. Method, that allows to determine individual risk of possible bilateral retinal detachment and recurrent retinal detachment was worked out and was shown in 30 patients with retinal detachment on the one eye and in 30 patients with bilateral rhegmatogenous retinal detachment.



Экспериментальные исследования

УДК 577.344.3+579.861.2+579.862.1

**ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НА КУЛЬТУРУ ESCHERICHIA COLI
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО И 10% ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА**

Н. В. Пасечникова, д. мед. н., проф., **А. В. Зборовская**, к. мед. н., **Т. Б. Кустрин**

ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова АМН Украины»
Одесса, Украина

Метою дослідження було визначити вплив поєданого застосування лазерного випромінювання та метиленового синього (МС) як фотосенсибілізатора в комбінації з диметилсульфоксидом — провідником МС через клітинну стінку на патогенний штамп Escherichia coli in vitro. Для експерименту використовувалися добові культури, які вирощувалися в пробірках на скошеному МПА при 37° С. Концентрації метиленового синього склали 0,2%, 0,1% і 0,05%. Також в кожен пробір з вказаною концентрацією МС додавали 10% розчин диметилсульфоксиду (ДМСО). Активацію досліджуваної речовини здійснювали за допомогою діодного лазера з довжиною хвилі 630 нм на протязі 3 або 5 хвилин. Дослідження показало, що ріст Escherichia coli пригнічується при використанні метиленового синього як фотосенсибілізатора в комбінації з 10% диметилсульфоксидом як провідником і лазерним випромінюванням з довжиною хвилі 630 нм. Максимальне пригнічення росту мікроорганізмів відмічається в групі без центрифугування при комбінації 10% диметилсульфоксиду та 0,1% метиленового синього, з подальшою фотоіндукцією лазером 630 нм.

Ключевые слова: патогенный штамм Escherichia coli, метиленовый синий, лазер, диметилсульфоксид.

Ключові слова: патогенний штамп Escherichia coli, метиленовий синій, лазер, диметилсульфоксид.

Введение. Учитывая трудности этиологической диагностики инфекционных заболеваний а, зачастую, и необходимость срочного назначения этиотропного лечения, очевидна актуальность поиска универсального метода воздействия на инфекционные агенты [4,6].

Альтернативным методом лечения локальных инфекционных процессов является фотодеструкция инфекционных агентов. Фотодеструкция (фотодинамическая антимикробная химиотерапия) — это уничтожение микроорганизмов с помощью фотосенсибилизаторов при облучении светом определенной длины волны [7, 8, 9, 10].

Диметилсульфоксид (ДМСО) впервые был получен в 1866 году, но лишь в начале 60-х годов XX ст.

появились сообщения по использованию ДМСО в фармакологии и медицине. Было установлено, что ДМСО обладает противовоспалительным и антимикробным действием благодаря его хорошей проницаемости через биологические мембраны. Более того, это соединение улучшает проницаемость биологических мембран и для других веществ, таким образом способствуя их поступлению внутрь клетки [3,5].

Целью исследования было изучение влияния сочетанного применения водного раствора метиленового синего как фотосенсибилизатора и 10% диметилсульфоксиду как его проводника, при ак-

тивации лазерным излучением с длиной волны 630 нм, на патогенный штамм *Escherichia coli in vitro*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ. Экспериментальное исследование сочетанного применения лазерного излучения и метиленового синего (МС) как фотосенсибилизатора проводили на культуре патогенного тест-штамма *Escherichia coli*. Сохраняли тест-штаммы на поверхности скошенного мясо-пептонного агара (МПА) при температуре 4°C. Для эксперимента использовались суточные культуры, которые выращивали в пробирках на скошенном МПА при 37°C. Раствор метиленового синего в концентрациях 0,05%, 0,1% и 0,2% готовили в дистиллированной воде.

При изучении темного воздействия вещества, то есть влияния 10% диметилсульфоксида (ДМСО) и метиленового синего в концентрациях 0,05%, 0,1% и 0,2% на рост тест-штамма без лазерного облучения, готовили жидкую среду Гисса с глюкозой без индикатора Андерееде. Среду разливали в 4 пробирки по 1 мл. Пробирки со средой стерилизовали в автоклаве при 0,5 атм. Культуру тест-микробов, выращенных на скошенном МПА в пробирках, смывали стерильным физиологическим раствором. Суспензию разводили стерильным физиологическим раствором до концентрации 2×10^4 клеток/мл. Из полученного инокулята отбирали по 50 мкл и вносили в каждую пробирку. Конечная концентрация клеток в 1 мл среды составила 1×10^3 клеток/мл. Культуру с 10% ДМСО или МС в разных концентрациях инкубировали в термостате при температуре 37°C на протяжении 24 и 48 час. Оценка результатов, то есть интенсивности роста культуры по данным оптической плотности раствора, проводилась через 24 и 48 час после воздействия на пробирки лазерным излучением без последующего центрифугирования или с ним. Интенсивность роста тест-штамма определяли по оптической плотности культуры, измеряемой на спектрофотометре «Spekol-10» (Германия) при длине волны 540 нм (чем интенсивнее рост культуры микроорганизмов, тем выше оптическая плотность).

Центрифугирование культуры с ДМСО без/после облучения проводилось для отделения суспензии культуры от МС, находящегося в жидкой среде. Суспензию микроорганизмов центрифугировали (1200 об/мин, 20 мин), после чего надосадочную жидкость сливали и стерильным физиологическим раствором доводили до концентрации 10^3 клеток/мл, отбирая 50 мкл в стерильную питательную среду (вариант с центрифугированием). В варианте после центрифугирования дальнейшее культивирование суспензии микроорганизмов проводилось без присутствия ДМСО в питательной среде, однако ДМСО находился в клетке микроорганизма.

В варианте без последующего центрифугирования культивирование микроорганизмов проводилось с присутствием ДМСО в питательной среде, однако, учитывая методику, его концентрация была незначительной. Мы предполагаем, что условия проведения эксперимента *in vitro* в определенной мере сопоставимы с условиями, в которых находится микроорганизм в тканях глаза [1].

Определение фотоиндуцированного влияния метиленового синего и ДМСО на микроорганизмы.

Методика определения изложена в нашей предыдущей публикации [2]. При проведении этого исследования в пробирки с разными концентрациями МС добавлялся 10% раствор диметилсульфоксида (ДМСО). Учитывая результаты, полученные нами ранее при изучении эффективности воздействия МС как фотосенсибилизатора на рост *Escherichia*

coli, мы решили использовать экспозицию лазерного облучения 1,5 и 3 мин [2]. Выбор длины лазерного излучения был обусловлен тем, что в пределах 620-670 нм находится спектр активации МС как фотосенсибилизатора (т. е. его перевод в возбужденное состояние).

Также следует учитывать тот факт, что МС выводится из тканей глаза через 24 часа, таким образом условия проведения эксперимента *in vitro* в определенной мере сопоставимы с условиями, в которых находится микроорганизм в тканях глаза, прокрашенных МС [1].

Контролем служила культура микроорганизмов, выращенная без МС, ДМСО и воздействия лазера (К) с концентрацией клеток 1×10^3 клеток/мл, а также культура (К_л), выращенная без исследуемых веществ, но с облучением лазером в течение 1,5 и 3 минут. Экспериментальные исследования во всех опытах проводились в трех повторах.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы «OpenOffice.org calc».

РЕЗУЛЬТАТЫ. В контрольных пробирках (К) рост культуры *Escherichia coli* составил через 24 часа $0,397 \pm 0,023$ ($\delta=0,05$) и через 48 часов $0,96 \pm 0,01$ ($\delta=0,02$).

При изучении воздействия лазерного излучения с длиной волны 630 нм на рост культуры *Escherichia coli* (К_л) установлено, что через 24 часа при экспозиции лазера 1,5 мин оптическая плотность культуры составила $0,580 \pm 0,051$ ($\delta=0,144$), при экспозиции 3 мин — $0,562 \pm 0,025$ ($\delta=0,07$). Через 48 часов получены следующие результаты: при длительности облучения 1,5 мин оптическая плотность культуры была $0,680 \pm 0,04$ ($\delta=0,11$), 3 минуты — $0,573 \pm 0,015$ ($\delta=0,41$). При этом обращает на себя внимание тот факт, что через 24 часа регистрируется статистически достоверная стимуляция роста микроорганизмов, в то время как через 48 часов — статистически достоверное подавление роста ($p < 0,05$).

При изучении влияния 10% ДМСО без облучения на рост культуры *Escherichia coli* (темновая проба), установлено, что через 24 и 48 часов по сравнению с контролем (К) статистически достоверного подавления роста микроорганизмов в группах без и после центрифугирования не отмечалось (табл. 1).

Таблица 1

Оптическая плотность культуры *Escherichia coli* в присутствии ДМСО 10% (отн. ед.)

Время оценки результатов	Без центрифугирования		После центрифугирования	
	M ± m	δ	M ± m	δ
24 часа	$0,402 \pm 0,003$	0,007	$0,402 \pm 0,02$	0,04
48 часов	$0,98 \pm 0,01$	0,02	$0,93 \pm 0,05$	0,1

При изучении свойств 10% ДМСО как фотосенсибилизатора при воздействии на культуру *Escherichia coli*, установлено, что через 24 часа происходит стимуляция роста микробов в обеих группах (без/после центрифугирования) по сравнению как с контролем, так и с темновым воздействием ДМСО (без лазера).

Статистически достоверной разницы при сравнении полученных данных с результатами воздействия лазера K_d не установлено в обеих группах при длительности лазерного облучения 1,5 и 3 минуты. Через 48 часов, по сравнению с контролем, статистически достоверное подавление роста микробов отмечалось в группе после центрифугирования (при обоих вариантах экспозиции лазера) и в группе без центрифугирования при длительности лазерного облучения 3 мин ($0,96 \pm 0,01$ и $0,58 \pm 0,15$, соответственно, $p < 0,05$). При сравнении полученных результатов с данными K_d , статистически достоверное подавление роста *Escherichia coli* отмечено только в группе после центрифугирования (при 1,5 и 3 мин лазерного воздействия $0,67 \pm 0,049$ и $0,60 \pm 0,146$ соответственно). В группе без центрифугирования статистически достоверной разницы с данными при воздействии лазера не уставлено (табл. 2).

Таблица 2

Оптическая плотность культуры *Escherichia coli* с ДМСО 10 % без и после центрифугирования (отн. ед.) с воздействием лазера

Время воздействия лазером, мин	ДМСО 10%			
	Без центрифугирования		После центрифугирования	
	M ± m	δ	M ± m	δ
24 часа				
1,5	$0,58 \pm 0,045$	0,13	$0,59 \pm 0,03$	0,08
3,0	$0,55 \pm 0,039$	0,11	$0,55 \pm 0,04$	0,11
48 часов				
1,5	$0,69 \pm 0,487$	0,14	$0,67 \pm 0,049$	0,14
3,0	$0,58 \pm 0,15$	0,42	$0,6 \pm 0,146$	0,39

Исходя из изложенных выше данных, следует сделать вывод, что 10% ДМСО не подавляет рост *Escherichia coli* при фотоиндукции лазером с длиной волны 630 нм, и, таким образом, не обладает свойствами фотосенсибилизатора. Это обусловлено стабильностью его химической структуры, поскольку ДМСО является апротонным растворителем, ограниченным сульфоксидом.

Определение совместного влияния метиленового синего и ДМСО на микроорганизмы. Сравнивая результаты оптической плотности культуры, полученные после ее инкубирования в присутствии МС в разных концентрациях и ДМСО, с результатами, зарегистрированными при инкубировании *Escherichia coli* только с ДМСО, установлено, что через 24 часа статистически достоверное подавление роста микроорганизмов отмечается в группах без и после центрифугирования при использовании 0,1% и 0,2% МС. При использовании 0,05% МС регистрируется стимуляция роста микроорганизмов как без, так и после центрифугирования ($0,42 \pm 0,014$ и $0,44 \pm 0,005$ соответственно). Через 48 часов статистически достоверное подавление роста микробов установлено только в группе без центрифугирования

при 0,05% и 0,1% МС. Во всех остальных вариантах статистически достоверной разницы не выявлено (табл. 3).

Таблица 3

Оптическая плотность культуры *Escherichia coli* в присутствии метиленового синего с ДМСО 10% (отн. ед.) без и после центрифугирования

Концентрация метиленового синего %	Без центрифугирования		После центрифугирования	
	M ± m	δ	M ± m	δ
24 часа				
0,05	$0,42 \pm 0,014$	0,03	$0,44 \pm 0,005$	0,01
0,1	$0,33 \pm 0,012$	0,02	$0,34 \pm 0$	0
0,2	$0,18 \pm 0,020$	0,04	$0,32 \pm 0,006$	0,01
48 часов				
0,05	$0,92 \pm 0,010$	0,02	$0,96 \pm 0,045$	0,09
0,1	$0,83 \pm 0,010$	0,02	$0,88 \pm 0,010$	0,02
0,2	$0,89 \pm 0,081$	0,16	$0,81 \pm 0,015$	0,03

Сравнивая оптическую плотность культуры после ее инкубирования в присутствии МС в разных концентрациях и ДМСО с результатами контроля и данными K_d , следует отметить, что при оценке результатов через 24 часа сохраняется та же тенденция, что изложена ранее. Через 48 часов статистически достоверное подавление роста микробов установлено в группе после центрифугирования при 0,1% и 0,2% МС и в группе без центрифугирования при 0,1% МС. Во всех остальных вариантах статистически достоверной разницы не выявлено.

Определение фотоиндуцированного влияния метиленового синего и ДМСО на Escherichia coli. При сравнении результатов фотоиндуцированного влияния ДМСО+МС и просто воздействия ДМСО+МС на оптическую плотность культуры, в группе после центрифугирования при всех концентрациях МС и при всех экспозициях лазера отмечается статистически достоверное снижение оптической плотности. Такая же тенденция отмечается при сравнении полученных результатов с контролем, данными K_d и результатами темновой пробы с ДМСО и МС. Через 24 часа максимальное подавление роста микробов наблюдается в группе с использованием 0,1% МС и экспозиции лазера 1,5 минуты. Однако статистически достоверной разницы в результатах, полученных при использовании разных концентраций МС и разной длительности лазерного облучения, не получено. Через 48 часов максимальное подавление роста микроорганизмов отмечается в группе с использованием 0,2% МС и экспозиции лазера — 1,5 минуты. Но статистически достоверной разницы в результатах, полученных при использовании разных концентраций МС и разной длительности лазерного облучения также не получено (табл. 4).

В группе без центрифугирования, при сравнении результатов, полученных через 24 часа, с данными всех других линий эксперимента, статистически

достоверное подавление роста микробов отмечается при использовании 0,1% МС и длительности лазерного воздействия 3 минуты ($0,02 \pm 0,031$, $p < 0,05$). Через 48 часов отмечается повышение значений оптической плотности культуры, с сохранением, однако, тенденции к более низким цифрам по сравнению с темновой пробой ДМСО+МС ($p < 0,05$) (табл. 5).

Таблица 4

Оптическая плотность культуры *Escherichia coli* в присутствии метиленового синего с ДМСО 10% после центрифугирования (отн. ед.) с воздействием лазера

Концентрация метиленового синего, %	Время действия лазера (мин)			
	1,5		3,0	
	M ± m	δ	M ± m	δ
24 часа				
0,05	0,16 ± 0,044	0,12	0,22 ± 0,035	0,10
0,1	0,1 ± 0,048	0,14	0,14 ± 0,025	0,07
0,2	0,09 ± 0,046	0,13	0,15 ± 0,032	0,09
48 часов				
0,05	0,18 ± 0,028	0,08	0,31 ± 0,034	0,10
0,1	0,17 ± 0,027	0,08	0,23 ± 0,021	0,06
0,2	0,11 ± 0,011	0,03	0,18 ± 0,040	0,11

Таблица 5

Оптическая плотность культуры *Escherichia coli* в присутствии метиленового синего с ДМСО 10% без центрифугирования (отн. ед.) с воздействием лазера

Концентрация метиленового синего, %	Время действия лазера (мин)			
	1,5		3,0	
	M ± m	δ	M ± m	δ
24 часа				
0,05	0,3 ± 0,035	0,10	0,38 ± 0,026	0,07
0,1	0,2 ± 0,051	0,14	0,02 ± 0,031	0,08
0,2	0,21 ± 0,020	0,06	0,15 ± 0,027	0,08
48 часов				
0,05	0,32 ± 0,029	0,08	0,37 ± 0,095	0,27
0,1	0,22 ± 0,048	0,14	0,28 ± 0,028	0,08
0,2	0,3 ± 0,024	0,07	0,31 ± 0,140	0,40

При сравнении результатов, полученных в группах после/без центрифугирования, максимальное, статистически достоверное подавление роста *Escherichia coli*, установлено в группе без центрифугирования с использованием ДМСО+10%МС и экспозицией лазера 3 минуты.

В то же время, при сопоставлении результатов, полученных в разных группах, установлено, что через 24 часа максимальное, статистически достоверное подавление роста микроорганизмов происходило при использовании 0,1% МС (вариант без центрифугирования) при длительности лазерного воздействия 3 мин. Через 48 часов максимальное подавление роста микроорганизмов наблюдалось в группе после центрифугирования с использованием 0,2% МС и экспозицией лазера 1,5 мин ($0,11 \pm 0,011$). МС выводится из тканей глаза через

24 часа, и в условиях, когда микроорганизм находится в тканях глаза, МС находится в межклеточном пространстве [1]. Таким образом, опираясь на результаты ранее проведенных исследований, мы считаем, что условия, которые были созданы для бактерий в пробирках без центрифугирования, то есть без отделения МС от суспензии клеток, являются наиболее приближенными к условиям *in vivo*. И наиболее оптимальной является длительность лазерного облучения 3 мин. Опираясь на полученные результаты, следует сделать вывод, что добавление 10% ДМСО к МС значительно потенцирует свойства МС как фотосенсибилизатора при воздействии на *Escherichia coli*.

По-видимому, это обусловлено повышением проницаемости стенки грам-негативных микроорганизмов для МС под воздействием ДМСО. Не вызывает сомнения тот факт, что ДМСО обладает хорошей проницаемостью через биологические мембраны, являясь проводником для многих препаратов, и повышает проницаемость разных тканей, с каковой целью он и используется в медицине, в частности — в офтальмологии (именно в концентрации 10%). Использование ДМСО в нашем случае способствовало более активному проникновению МС через липополисахариды, которые находятся в стенке *Escherichia coli* и затрудняют прокрашивание микроорганизмов в обычных условиях. В то же время ДМСО не повреждает биологические барьеры и мембраны, стенки сосудов и гемато-энцефалический барьер. ДМСО тормозит процесс перекисного окисления липидов, обладает мембрано-протективными свойствами. Характерно, что окислительно-восстановительные процессы с участием ДМСО могут осуществляться не только в условиях *in vitro*, но и в условиях *in vivo*, поскольку он в небольших количествах синтезируется в биологических системах как продукт деградации серосодержащих аминокислот, то есть, это соединение является природным [3,5]. Тем более вызывает интерес тот факт, что ДМСО, несмотря на его протективные свойства, потенцирует свойства МС как фотосенсибилизатора, механизмом действия которого, в отличие от ДМСО, как раз является значительное потенцирование свободно-радикальных процессов.

ВЫВОДЫ

1. Диметилсульфоксид 10% не подавляет рост *Escherichia coli* ни самостоятельно, ни в комбинации с лазерным излучением с длиной волны 630 нм, ни в комбинации с метиленовым синим.

2. При комбинации 10% диметилсульфоксида и 0,1% метиленового синего с последующей фотоиндукцией лазерным излучением 630 нм максимальное подавление роста микроорганизмов изученного вида отмечается в группе без центрифугирования.

3. Диметилсульфоксид потенцирует свойства 0,1% метиленового синего как фотосенсибилизатора при воздействии на *Escherichia coli*.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Аль-Асталь Мухаммед Салих** Фотодинамическая терапия неоваскуляризации роговицы с применением метиленового синего и лазерного излучения длины волны 578 нм: Автореф. дис. на соискание науч. степени канд. мед. наук: спец. 14. 00. 08 «Офтальмология» / Аль-Асталь Мухаммед Салих // Алматы, 2006. — 24 с.
2. **Пасечникова Н. В.** Фотодинамическое воздействие метиленового синего на культуру *Escherichia coli* при его активации лазерным излучением. / Н. В. Пасечникова, А. В. Зборовская, Т. Б. Кустрин // Офтальмол. журн. — № 3. — 2009. — С. 60-64.
3. **Райхардт К.** Растворители и эффекты среды в органической химии. / К. Райхардт. — М.: Мир, 1991 — 763с.
4. **Теплинская Л. Е.** Современный взгляд на проблему увеитов. / Л. Е. Теплинская // Актуальные вопросы офтальмологии. Тез. докл. — часть I. — М., 2000г. — С. 32–39.
5. **Фиалков Ю. Я.** Растворитель как средство управления химическим процессом. / Ю. Я. Фиалков. — Л.: Химия, 1990 — 283с.
6. **Шатилова Р. И.** Диагностика и лечение увеитов: состоящие проблемы и перспективы. / Р. И. Шатилова, Л. А. Бархатова // Офтальмол. журн. — 1995. — №1. — С. 1–6.
7. **Chang T. W.** Genital herpes: Treatment with methylene blue and light exposure. / T. W. Chang, N. Fiumara, L. Weinstein // International Journal of Dermatology. — 1975 Jan-Feb. — vol. 14. — Issue 1. — p. 69-71
8. **Malik Z.** Photodynamic inactivation of Gram- negative-bacteria: problems and possible solutions. / Z. Malik, H. Ladan, Y. Nitzan // Journal of Photochemistry and Photobiology. — 1992 Jul. — vol. 14- № 3. — p. 262-6.
9. **Mellish K. J.** In vitro photodynamic activity of a series of methylene blue analogues. / K. J. Mellish, R. D. Cox, D. I. Vernon, J. Griffiths, S. B. Brown // Journal of Photochemistry and Photobiology. — 2002 Apr. — vol. 75. — Issue 4. — p. 392-7
10. **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. — Issue 2. — p. 165-73.

Поступила 15.10.2009

Рецензент д-р мед. наук Э. В. Мальцев

PHOTODYNAMIC EFFECT OF METHYLENE BLUE AND 10% DIMEXID ON THE CULTURE OF ESCHERICHIA COLI

Pasyechnikova N. V., Zborovskaya A. V., Kustrin T. B.

Odessa, Ukraine

There was studied the influence of combined applications of laser radiation and methylene blue (MB) as a photosensitizer in a combination with dimexid as a MB conductor through the cellular wall on the pathogenic culture of *Escherichia coli* in vitro. Daily cultures were used for the experiment, which were grown up in test tubes on oblique agar at 37°C. The concentrations of MB were 0. 2%, 0. 1% and 0. 05%. Each test tube with specified concentration of MB was added 10% solution of dimexid. Activation of the cells with methylene blue was carried out by means of laser radiation with a wave length of 630 nm for 3 or 5 minutes. The investigation showed that growth of *Escherichia coli* had been suppressed. The maximal suppression of microorganism growth is noted in the group without centrifugation with the use of 0. 1 % MB with addition of 10% solution of dimexid with following laser radiation with wave-length of 630 nm.

