

Выводы. Внутриматочное введение озонированной эмульсии коровам–первотелкам с целью предупреждения послеродового эндометрита по совокупности ряда клинических признаков оказывает более выраженный профилактический эффект в сравнении с гинодиксином, способствует сокращению периода от отела до очередной стельности и требует меньшего количества осеменений для оплодотворения.

Литература. 1. Конопельцев И.Г. Озонотерапия и озонпрофилактика воспалительных заболеваний и функциональных расстройств матки у коров: автореф. дис. ...д-р вет. наук. Воронеж, 2004; 40. 2. Муравина Е.С. Разработка и эффективность способа терапии больных послеродовым эндометритом коров с применением озонированной эмульсии: дис. ... канд. вет. наук. Воронеж, 2013; 149. 3. Нежданов А.Г., Лободин К.А. Влияние «Утеротона» на заболеваемость коров субинволюцией матки и их воспроизводительную функцию. - Матер. Междунар. конф. Воронеж, 2000; С. 188 - 189. 4. Скоморова М.Н. Терапевтическая эффективность гинодиксина при эндометритах и маститах коров, вызванных условно - патогенной микрофлорой: автореф. дис. ... канд. вет. наук. Новосибирск, 2013; 20. 5. Чучалин С.Ф. Применение озонированного оливкового масла при послеродовом эндометрите у коров-первотелок: автореф. дис. ... канд. вет. наук. Воронеж, 2004; 20.

УДК 619:636,22/28

АНТИМИКРОБНОЕ ДЕЙСТВИЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО

Павлов А.В., Смертина Е.Ю.

Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока, г. Новосибирск, Россия

Введение. Распространение среди патогенных микроорганизмов множественной устойчивости к антибиотикам форсирует исследования в области новых методов лечения заболеваний, вызываемых условно-патогенной микрофлорой, в том числе акушерско-гинекологических патологий. Одним из таких методов является фотодинамическая терапия, основанная на применении светочувствительных веществ (фотосенсибилизаторов) и оптического излучения. Действие фотосенсибилизаторов на микроорганизмы впервые обнаружил немецкий медик Oscar Raab, в 1900 году он представил доклад и опубликовал результаты своих экспериментов в области фототоксикологии [1]. Представленные результаты были успешно опробованы в терапии больных карциномой кожи, сифилисом и туберкулезом [2]. Эффективность данного метода оказалась достаточно высокой, и за ним было закреплено название «фотодинамический» [3]. Вскоре в связи с открытием антибиотиков исследования в этой области были приостановлены.

Механизм действия фотодинамической терапии может быть представлен как комбинированное взаимодействие трех компонентов: фотосенсибилизатора, соответствующего ему оптического излучения видимого спектра и молекулярного кислорода. При облучении молекулам кислорода сообщается дополнительная энергия, что сопровождается их диссоциацией и образованием радикалов – супероксидного и синглетного кислорода. Селективно в пораженных клетках они вызывают цитотоксические и цитостатические процессы, клетки здоровых тканей остаются неповрежденными, так как не накапливают фотосенсибилизаторы. Это явление, по нашему мнению, может быть использовано в терапии инфекционных заболеваний, особенно имеющих локальный характер. Имеются отдельные работы по эффективной терапии таких заболеваний, например, кандидоза полости рта, вызванного антибиотикорезистентным штаммом *Candida albicans*, в ходе которой применяли в качестве фотосенсибилизатора метиленовый синий краситель и кадмий-галлий-фосфидный лазер с длиной волны 620 нм и экспозицией 5 минут [4]. Также

показано подавление роста *Staphylococcus aureus* в результате воздействия метиленового синего красителя с последующим облучением LED – источником с длиной волны 620 нм [5]. Использование данного красителя объясняется, прежде всего, его доступностью и широким распространением в лабораторной практике, поэтому представляет определенный интерес поиск наиболее эффективного сочетания концентрации красителя и времени его облучения.

Цель нашей работы: изучить динамику антимикробного действия раствора фотосенсибилизатора красителя метиленового синего с разной концентрацией и временем его облучения на *Paramecium caudatum*. Нами были проведены два опыта, в первом – планировали изучить выживание парамеции в растворе метиленового синего красителя с разной концентрацией, во втором – выживание парамеций в этих растворах после проведения облучения.

Материалы и методы исследований. Объектом исследований была выбрана культура *Paramecium caudatum*, так как парамеции являются стандартным тест-объектом для определения токсичности. Подвижность парамеций определяли согласно ГОСТ Р 52337-2005 «Корма, комбикорма, комбикормовое сырье, методы определения общей токсичности». В нашей модификации: методики подвижности парамеций условно оценивали в баллах от 5 до 1, высокоподвижные – 5, погибшие – 1.

В работе использовали растворы красителя метиленового синего в дистиллированной воде с концентрацией 0,02%, 0,1%, 1,0%. Указанные растворы имели спектр поглощения оптического излучения в диапазоне 618-668 нм. Облучение проводили специально разработанным LED-излучателем с длиной волны 620 нм и выходной мощностью 3500 мВт. Проведены два опыта по изложенным далее схемам. В первом опыте оценивали воздействие растворов различной концентрации красителя метиленового синего на культуру *Paramecium caudatum* без дополнительного облучения. В опыте на предметное стекло помещали взвесь культуры *Paramecium caudatum* в количестве 0,2 мл, затем к ней добавляли 0,2 мл раствора красителя метиленового синего в концентрациях 0,02%, 0,1% и 1%. Оценивали подвижность парамеций при увеличении $\times 100$ и $\times 400$. В контроле к культуре *Paramecium caudatum* не добавляли раствор метиленового синего, проводя наблюдение. Время наблюдения составляло 1, 2, 3, 5, 10, 15 минут с начала опыта.

Во втором опыте изучали воздействие растворов красителя метиленового синего в различной концентрации на культуру *Paramecium caudatum* при дополнительном облучении.

Опыт проводили по схеме, аналогичной первому опыту, но с предварительным облучением культуры *Paramecium caudatum* и раствора красителя метиленового синего в различной концентрации в течение 15 минут. В контроле культуру *Paramecium caudatum* облучали при тех же параметрах облучателя, но без раствора фотосенсибилизатора.

Опыты были проведены в пяти повторах для последующей статистической обработки по Фишеру в программе MS EXCEL 2003.

Результаты и обсуждение. Как указано в предыдущем разделе, в первом опыте оценили воздействие растворов различной концентрации красителя метиленового синего на культуру *Paramecium caudatum* без дополнительного облучения. Статистически обработанные результаты первого опыта представлены в таблице 1.

В опыте с концентрацией раствора метиленового синего 0,02% подвижность парамеций относительно контроля снизилась: через 1 минуту наблюдения на 4,8%. Через 2, 3, 5, 10 минут подвижность парамеций относительно контроля снизилась на 4,8%, 23,8%, 39,1% и 66,7%, соответственно. При завершении наблюдений через 15 минут от начала опыта подвижность парамеций относительно контроля снизилась на 76,2%. В растворе с концентрацией метиленового синего 0,1% подвижность парамеций относительно контроля снизилась через 1 минуту наблюдения на 9,52%, через 2, 3, 5, 10 минут подвижность парамеций относительно контроля снизилась на 19,05%, 33,33%, 71,42% и 76,2%, соответственно. При завершении наблюдений через 15 минут от начала опыта подвижность парамеций относительно контроля снизилась на 76,2%. В растворе с концентрацией метиленового синего 1% подвиж-

ность парameций относительно контроля снизилась через 1 и 2 минуты наблюдения на 28,5% и 42,8%, соответственно. Через 3, 5, 10 и 15 минут подвижность парameций относительно контроля снизилась на 76,2% независимо от времени экспозиции.

Таблица 1 – Изменение подвижности парameций в растворе красителя метиленового синего

| Время экспозиции (мин.) | Концентрация раствора | | | | | | Контроль |
|-------------------------|-----------------------|------------------------|-----------|------------------------|-----------|------------------------|----------|
| | 0,02% | | 0,1% | | 1% | | |
| | Ср. знач. | Разница с контролем, % | Ср. знач. | Разница с контролем, % | Ср. знач. | Разница с контролем, % | |
| 0 | 4.2±0.2 | | 4.2±0.2 | | 4.2±0.2 | | 4.4±0.2 |
| 1 | 4±0 | -4.8 | 3.8±0.2 | -9.52 | 3±0 | -28.5** | 4±0 |
| 2 | 4±0 | -4.8 | 3.4±0.2 | -19.05* | 2.4±0.2 | -42.8*** | 4±0 |
| 3 | 3.2±0.3 | -23.8 | 2.8±0.3 | -33.33* | 1±0 | -76.2* | 4±0 |
| 5 | 2.6±0.2 | -39.1** | 1.2±0.2 | -71.42* | 1±0 | -76.2* | 4±0 |
| 10 | 1.4±0.2 | -66.7* | 1±0 | -76.2* | 1±0 | -76.2* | 4±0 |
| 15 | 1±0 | -76.2* | 1±0 | -76.2* | 1±0 | -76.2* | 4±0 |

Примечания: * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$, *** – $P < 0,001$.

Таким образом, независимо от концентрации раствора красителя метиленового синего при его воздействии на культуру *Paramecium caudatum* без дополнительного облучения, подвижность парameций через 15 минут снижалась на 76,2%. Однако аналогичное снижение подвижности парameций отмечено уже после 3-минутной экспозиции при концентрации раствора 1%.

Результаты второго опыта при изучении воздействия растворов красителя метиленового синего в различной концентрации на культуру *Paramecium caudatum* при дополнительном облучении представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Изменение подвижности парameций в растворе метиленового синего после предварительного облучения

| Время экспозиции (мин.) | Концентрация раствора | | | | | | Контроль |
|-------------------------|-----------------------|------------------------|-----------|------------------------|-----------|------------------------|----------|
| | 0,02% | | 0,1% | | 1% | | |
| | Ср. знач. | Разница с контролем, % | Ср. знач. | Разница с контролем, % | Ср. знач. | Разница с контролем, % | |
| 0 | 3,8±0,2 | | 3,2±0,2 | | 2,2±0,2 | | 4,4±0,2 |
| 1 | 2,8±0,2 | -26,3** | 2±0 | -37,5** | 1±0 | -76,2* | 4±0 |
| 2 | 2,8±0,2 | -26,3** | 1±0 | -76,2* | 1±0 | -76,2* | 4±0 |
| 3 | 1,8±0,2 | -52,6*** | 1±0 | -76,2* | 1±0 | -76,2* | 4±0 |
| 5 | 1±0 | -76,2* | 1±0 | -76,2* | 1±0 | -76,2* | 4±0 |
| 10 | 1±0 | -76,2* | 1±0 | -76,2* | 1±0 | -76,2* | 4±0 |
| 15 | 1±0 | -76,2* | 1±0 | -76,2* | 1±0 | -76,2* | 4±0 |

Примечания: * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$, *** – $P < 0,001$.

В опыте с концентрацией раствора метиленового синего 0,02% подвижность парameций относительно контроля снижалась интенсивнее: на 26,3%, 52,6% через 1 и 3 минуты, соответственно. Через 5, 10 и 15 минут подвижность парameций относительно контроля стабильно снизилась на 76,2%. В растворе с концентрацией метиленового синего 0,1% подвижность парameций относительно контроля снизилась через 1 минуту наблюдения на 37,5%. Через 2, 3, 5, 10 и 15 минут подвижность па-

рамеций относительно контроля снизилась на 76,2%. В растворе с концентрацией метиленового синего 1% в течение первой минуты подвижность парамеций снизилась на 76,2%, после чего они погибли (данные достоверны). В контроле подвижность парамеций не изменялась.

Таким образом, в первом опыте без дополнительного облучения гибель парамеций наступила в 0,02% растворе через 15 минут, в 0,1% – через 10 минут, в 1% – через 3 минуты.

Во втором опыте при дополнительном облучении гибель парамеций наступила в 0,02% растворе через 5 минут, в 0,1% – через 2 минуты, в 1% – через 1 минуту. Гибель парамеций сопровождалась изменением формы клетки на шарообразную с последующей деструкцией клеточной стенки. В контроле парамеции выжили. Из приведенных данных следует, что антимикробные свойства метиленового синего красителя прямо пропорциональны его концентрации и времени облучения.

Выводы. Разработка новых методов терапии заболеваний, вызываемых условно-патогенной микрофлорой, в том числе акушерско-гинекологических патологий, обусловлена в немалой степени появлением множественной устойчивости микроорганизмов к антибиотикам. Кроме того, использование антибиотиков при лечении акушерско-гинекологических заболеваний ограничено требованиями к экологической безопасности продукции животноводства. Поиск дешевых и эффективных медикаментозных средств для применения в животноводстве остается актуальной и своевременной задачей.

Проведенные исследования, результаты которых представлены в данной статье, убедительно показали - метиленовый синий краситель, используемый в качестве фотосенсибилизатора, является перспективным препаратом с выраженными антимикробными свойствами, величина которых зависит от времени экспозиции излучения.

Метиленовый синий краситель, независимо от концентрации раствора при его воздействии на культуру *Paramecium caudatum* без дополнительного облучения, снижает подвижность парамеций через 15 минут на 76,2% с последующей гибелью. Аналогичное снижение подвижности парамеций на 76,2% с последующей гибелью при концентрации раствора метиленового синего 0,1% наступает через 10 минут, а при концентрации раствора 1% - через 3 минуты.

При облучении культуры *Paramecium caudatum* специально разработанным LED-излучателем с длиной волны 620 нм и выходной мощностью 3500 мВт снижается подвижность парамеций на 76,2% с последующей гибелью, которая наступает через 5 минут при минимальной концентрации раствора 0,02%. Повышение концентрации раствора метиленового синего до 0,1% приводит к гибели парамеций через 2 минуты, а при концентрации раствора 1% гибель наступает через 1 минуту после начала наблюдений.

Облучение культуры *Paramecium caudatum* LED-излучателем с длиной волны 620 нм и выходной мощностью 3500 мВт позволяет повысить антимикробные свойства метиленового синего красителя в 3 раза при любой концентрации раствора от 0,02 до 1%. Наиболее эффективным является использование 1% водного раствора при времени экспозиции 15 минут.

Литература. 1. Von Tappeiner H. *Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O. Raab* // *Munch. Med. Wochenschr.* — 1900. — 1. — S. 5—7. 2. Von Tappeiner H., Jesionek A. *Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen* // *Munch. Med. Wochenschr.* — 1903. — 47. — S. 2042—2044. 3. Von Tappeiner H., Jodlbauer A. *Über die Wirkung der photodynamischen Stoffe auf Protozoen und Enzyme* // *Dtsch. Arch. Klein. Med.* — 1904. — 80. — S. 427—487. 4. Pupo Y.M., Gomes G.M., Santos E.B., Chaves L., Michel M.D., Kozłowski V.A. Jr., Gomes O.M., Gomes J.C. *Susceptibility of Candida albicans to photodynamic therapy using methylene blue and toluidine blue as photosensitizing dyes.* *Acta Odontol Latinoam.* — 2011. — Vol. 24 (2). — P. 188-192. 5. Павлов А.В. *Антимикробное действие фотосенсибилизатора метиленового синего на культуру Staphylococcus aureus* / *Соавт.: Е.Ю. Смертина, Н.А. Донченко* // *Сиб. вест. с-х науки.* — 2013. — № 3. — С. 91–94.