

УДК 57.042+573.6
DOI 10.17721/1728.2748.2021.86.23-27

П. Вірич, канд. біол. наук,
О. Надтока, канд. хім. наук,
Н. Куцевол, д-р хім. наук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

КОМБІНАЦІЯ ГІДРОГЕЛЮ, ТОЛУЇДИНОВОГО СИНЬОГО ТА СВІТЛА 600 НМ ДЛЯ ІНАКТИВАЦІЇ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN VITRO*

Порушення цілісності шкірних покривів супроводжується бактеріальною контамінацією новоутвореної рани. Засоби, спрямовані на запобігання та лікування інфекції відкритих ран, передбачають мінімізацію забруднення пошкоджених тканин і прискорення їхньої регенерації. З появою антибіотикорезистентних штамів розпочався пошук альтернативних способів інактивації мікроорганізмів. Використання фотосенсибілізаторів з максимумами поглинання в червоній та інфрачервоній ділянках спектра дозволяє мінімізувати світлове навантаження на тканини, зберігаючи водночас необхідні бактерицидні ефекти. Метою досліджень є з'ясування ефективності поєднання гідрогелів із толуїдиновим синім (ТС) й опромінення світлом 600 нм для інгібування *in vitro* зростання *Staphylococcus aureus*. Після 3 год інкубації гідрогелів з ТС у водному розчині не спостерігається формування рівноважного стану. Протягом цього часу відбувається десорбція 57 % ТС з гідрогелю поліакриламід (ПАА) і 43 % – декстран-поліакриламід (Д-ПАА). Швидкість процесу залежить від типу полімеру. Десорбція проходить на 30 % швидше для Д-ПАА ніж ПАА. Опромінення суспензії *S. aureus* світлом 600 нм сприяє зниженню кількості колонієутворювальних одиниць (КУО) на 25 % за дози вище 4 Дж/мл. За короткої експозиції гідрогелів (20 хв) у суспензії мікроорганізмів та їхнього опромінення світлом 600 нм відбувається зниження кількості КУО на 33 % за використання ПАА та на 15 % – Д-ПАА. Після 50 хв бактерицидна активність для ПАА практично не змінюється, а для Д-ПАА показник становить 35 %. Подальше збільшення тривалості інкубації до 80 хв забезпечує збільшення ефекту до 50 % для Д-ПАА. Отже, систему Д-ПАА із ТС у поєднанні зі світлом 600 нм можна використовувати з метою інактивації *S. aureus*.

Ключові слова: фотодинамічна інактивація бактерій, толуїдиновий синій, поліакриламід, декстран-поліакриламід, фотодинамічна терапія.

Вступ. Порушення цілісності шкірних покривів супроводжується бактеріальною контамінацією новоутвореної рани. За відсутності факторів ризику, таких як порушення кровотоку, артеріальна недостатність, венозна гіпертензія, цукровий діабет та інших, імунна система здатна знешкодити мікроорганізми і сприяти нормальній регенерації тканин [1]. Хронічні рани характеризуються тривалим запаленням, порушенням ремоделюванням мактриксу, дефектною реепітеліалізацією й іншими процесами, що є індивідуальними [2]. Крім того, спостерігаємо взаємодії між бактеріями в рані й організмом. Вони варіюють від забруднення через колонізацію до розвитку місцевої інфекції, а в гіршому варіанті – до запалення підшкірних тканин і сепсису [3]. Засоби, спрямовані на запобігання та лікування бактеріальної інфекції відкритих ран передбачають мінімізацію бактеріального забруднення пошкоджених тканин і прискорення їхньої регенерації [4]. Із цієї метою часто використовують методи ізоляції рани від навколишнього середовища та їхню обробку антисептичними засобами. Проте широке застосування антибіотиків ініціювало виникнення і поширення резистентних штамів мікроорганізмів [5]. Альтернативним методом є фотодинамічна терапія – селективний метод знешкодження клітин-мішеней без негативних ефектів на оточуючі тканини [6]. Однією з переваг такого підходу є відсутність резистентності та селективності щодо різних штамів мікроорганізмів. Метод передбачає присутність у клітинах-мішенях ендогенних або екзогенних фотосенсибілізаторів, які за поглинання світла певних довжин хвиль здатні ініціювати процеси, що пошкоджують життєво важливі внутрішньоклітинні структури [7–9]. Цільова доставка та підтримка необхідної кількості фотосенсибілізатора в рані дозволяє мінімізувати навантаження на організм і підвищити ефективність методу [10]. Як носії використовують полімерні матеріали різного складу та структури, що здатні утримувати біологічно активні сполуки та вивільняти їх [11–14]. Гідрогелі поєднують у собі багато корисних властивостей: високий вміст води, біосумісність, низьку токсичність, сорбційну здатність тощо, які прискорюють загоєння ран [15, 16].

Використання фотосенсибілізаторів із максимумами поглинання в червоній та інфрачервоній ділянках спек-

тра дозволяє мінімізувати світлове навантаження на тканини, зберігаючи водночас необхідні бактерицидні ефекти [17]. Одними з найдоступніших фотосенсибілізаторів такого типу є метиленовий синій і ТС. Останній застосовують з метою інактивації патогенних мікроорганізмів ротової порожнини [18], очей [19, 20], руйнування біоплівки [21]. Перевагами поєднання гідрогелів і фотосенсибілізаторів є підтримка терапевтичної концентрації фармакологічно активної речовини в рані та запобігання контакту пошкоджених тканин із навколишнім середовищем [22].

Метою досліджень є з'ясування ефективності поєднання гідрогелів із ТС й опромінення світлом 600 нм для інгібування *in vitro* росту *Staphylococcus aureus*.

Матеріали й методи. У дослідженнях використано гідрогелі на основі ПАА та Д-ПАА з варіюванням кількості зшиваючого агента N,N'-метилен-біс-акриламід 0,4 % [23]. Для синтезу використовували декстран від Fluka з $M_w = 500 \cdot 10^5$ г/моль, акриламід від Sigma-Aldrich, N,N'-метилен-біс-акриламід від Sigma-Aldrich. Синтез гідрогелів детально описано у праці О. Надтоки з колегами [23].

Для оцінки швидкості дифузії ТС у досліджених гідрогелях використовували розчин барвника в концентрації 30 мкг/мл, що має максимум поглинання 600 нм.

Насичення матеріалу (1 г) проводили у 25 мл 30 мкг/мл ТС протягом 24 год. Використовували гідратований гідрогель. Розраховували кількість барвника, що адсорбувався гідрогелем. Для цього фотометрично (ULAB 102 UV) визначали концентрацію ТС в розчинах інкубації після 24 год. Вимірювання дифузії ТС із гідрогелів проводили з інтервалом 10 хв протягом 180 хв. Відношення гідрогелю до води – 1 : 4. Для визначення швидкості виходу барвника проводили розрахунок першої похідної рівняння наростання концентрації в розчині інкубації з часом. Математичну обробку отриманих результатів виконували за допомогою програми OriginLab 8.0. Повторність дослідів трикратна.

Мікробіологічні дослідження. У дослідженнях використовували дикі штами *Staphylococcus aureus*, отримані на елективному середовищі жовтково-сольового агару такого складу (%): м'ясо-пептонний агар (МПА) –

70 (v/v), хлорид натрію – 10 (v/w), жовткова емульсія в 0,9 % NaCl – 20 (v/v), рН7,3 (рН-метр рН-150 МІ).

Оцінку бактерицидної активності гідрогелів із ТС за опромінення світлом 600 нм проводили в суспензії *S. aureus*, що перебували в середовищі Мюллера – Хінтона № 2 такого складу (г/л): гідролізат казеїну – 17,5 г/л, гідролізат серця – 2 г/л, крохмаль водорозчинний (ЧДА) – 1,5 г/л, рН 7,3 (рН-метр рН-150 МІ). Початкова кількість КУО в суспензії перебувала в межах 8-12*10⁶/мл. До аліквоти суспензії (4 мл) додавали відповідний гідрогель із ТС (1 г) й інкубували протягом 20, 50 та 80 хв, після чого промінювали світлом 600 нм ("LIKA-Led", Фотоніка Плюс, Україна) потужністю 0,1 Дж/с та дозою 5 Дж/мл. Антибактеріальну активність визначали шляхом порівняння кількості КУО в дослідних і паралельних контрольних варіантах, що перебували в аналогічних умовах без додавання гідрогелю й опромінення

світлом. Підрахунок КУО проводили в камері Горяєва на мікроскопі Olympus BX53 з люмінесцентним блоком X-CiteSeries 120 Q і камерою-детектором Olympus DP72. Суспензію попередньо фарбували розчином акридинового помаранчевого з кінцевою концентрацією барвника 0,001 % протягом 2 хв. Люмінесценцію досліджували за довжини хвилі емісії – 530 нм.

Математичну та статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою тестів Шапіро – Вілка ($p > 0,05$) та Шеффе (ANOVA, $p < 0,05$) у програмному забезпеченні OriginLab 8.0. Повторність дослідів трикратна.

Результати досліджень та їхнє обговорення. Сорбційні властивості гідрогелів. Гідрогелі ПАА та Д-ПАА здатні адсорбувати й утримувати більшу кількість ТС на 30 % та більш ніж у два рази відповідно ніж концентрація барвника в розчині (табл. 1).

Таблиця 1. Сорбційні характеристики ТС гідрогелів ПАА і Д-ПАА

Гідрогель	Абсорбція ТС 24 год		Десорбція ТС 180 хв		
	Концентрація у розчині, мкг/мл	Концентрація у гідрогелі, мкг/г	Концентрація у гідрогелі, мкг/г	Десорбція, %	Швидкість десорбції, хв ⁻¹
Контрольний розчин	29,2±1,2	–	–	–	–
ПАА	24,8±1,3	32,3±1,2	13,8±0,9	57,2	0,3559
Д-ПАА	20,7±1,0	45,0±1,1	25,7±1,1	42,9	0,4840

Після 3 год інкубації гідрогелів з ТС у водному розчині формування рівноважного стану не спостерігаємо. Звідси можна зробити такий висновок: кількість адсорбованого барвника достатня для тривалого його вивільнення у водне середовище, що перевищує об'єм гідрогелю в чотири рази. Протягом цього часу відбуваєть-

ся десорбція 57 % від загальної кількості ТС у гідрогелі ПАА і 43 % – Д-ПАА (табл. 1). Швидкість процесу також залежить від типу полімеру. Десорбція проходить на 30 % швидше для Д-ПАА ніж ПАА. Криві дифузії ТС із гідрогелів наведено на рис. 1.

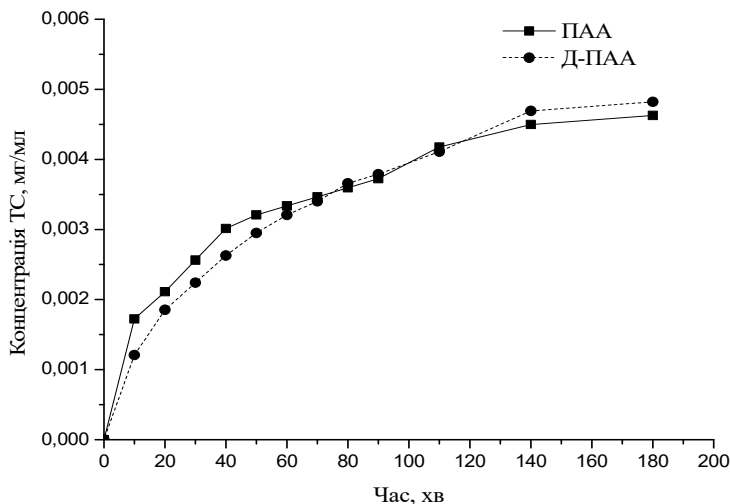


Рис. 1. Приклад дифузії ТС у водний розчин із гідрогелів ПАА та Д-ПАА

Отже, гідрогелі ПАА та Д-ПАА можуть слугувати джерелом ТС із можливістю його десорбції в навколишнє середовище.

Бактерицидна активність in vitro. Фотодинамічна терапія є альтернативним способом знешкодження патогенних мікроорганізмів у ранах, виразках, запальних процесах очей і ротової порожнини [24]. Використання нетоксичних фотосенсибілізаторів і світла з довжинами хвиль понад 550–600 нм знижує навантаження на організм за збереження необхідних бактерицидних ефектів. У процесі лікування відкритих ран важливою умовою є обмеження контакту пошкоджених тканин із навколишнім середовищем, щоб запобігти бактеріальній контамінації. Створення пов'язок з активними компонентами

дозволяє прискорити процеси регенерації тканин, знизити ризик розвитку запалення й інактивувати присутні мікроорганізми. Нами показано, що гідрогелі здатні адсорбувати ТС у достатній кількості. Процес можливо контролювати завдяки зміні структури полімеру, що впливає і на швидкість десорбції. Це є важливим показником, оскільки забезпечується підтримка постійної кількості фотосенсибілізатора під гідрогелем. У попередніх дослідженнях ми показали схожі залежності для метиленового синього [25].

Важливим елементом ФДТ є присутність ефективного фотосенсибілізатора, що здатен у процесі поглинання квантів світла ініціювати вільнорадикальні процеси, які порушують функціонування клітин. Ми перевірили придат-

ність системи гідрогель-фотосенсибілізатор для фотоінактивації *S. Aureus* у суспензії. Метод дозволяє імітувати відкриті рани з певною кількістю рідини, що є ідеальним середовищем розмноження мікроорганізмів.

Опромінення суспензії *S. aureus* світлом 600 нм сприяє зниженню кількості КУО на 25 % за дози вище

4 Дж/мл (рис. 2). Для подальших досліджень ми використали дозу опромінення 5 Дж/мл. Ефект інактивації КУО можливий завдяки наявності в бактерій внутрішніх фотосенсибілізаторів, насамперед продуктів метаболізму порфіринових структур, які у процесі поглинання світла здатні порушувати фізіологічно важливі біохімічні процеси.

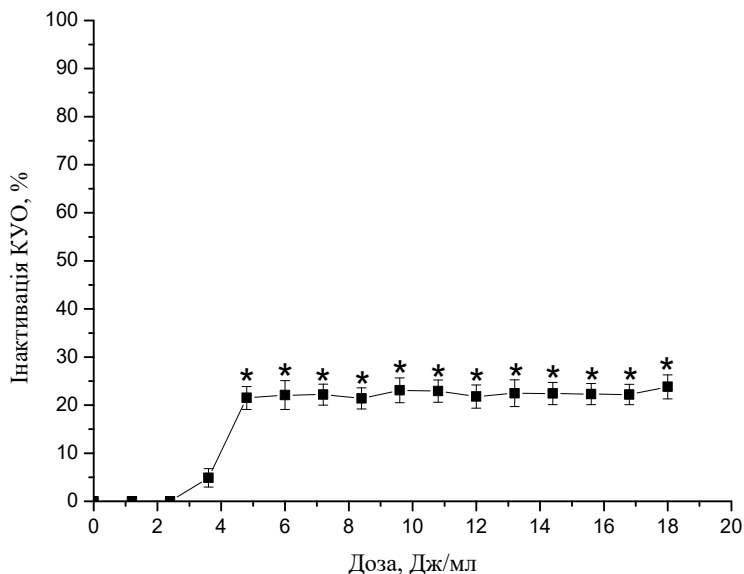


Рис. 2. Бактерицидна дія світла видимого діапазону з довжиною хвилі 600 нм та енергією випромінювання 100 мДж/с на суспензію *S. aureus* за різної дози опромінення ($m \pm SD$, $n = 3$, $*p < 0,05$)

Для дослідження інактивації *S. aureus* за поєднання гідрогелів ПАА, Д-ПАА із ТС і світла 600 нм обрали часові проміжки 20 хв, що відповідає етапу швидкої дифузії барвника зі структури гідрогелю, 50 хв – відповідно, кривих дифузії, дорівнює половині від максимальної концентрації ТС у розчині, 80 хв – близька до максимальної концентрації ТС з можливістю подальшої його десорбції з гідрогелю.

За умови короткої експозиції гідрогелів у суспензії мікроорганізмів і подальшого їхнього опромінення світлом 600 нм спостерігаємо зниження кількості КУО на 33 % за використання ПАА та 15 % – Д-ПАА як носіїв ТС (рис. 3). Результати відповідають швидкій десорбції ТС з ПАА щодо Д-ПАА на початкових етапах перебування гідрогелів у водному розчині (рис. 1). Після 50 хв ефективність для ПАА практично не змінюється, а для Д-ПАА показник становить 35 % (рис. 2).

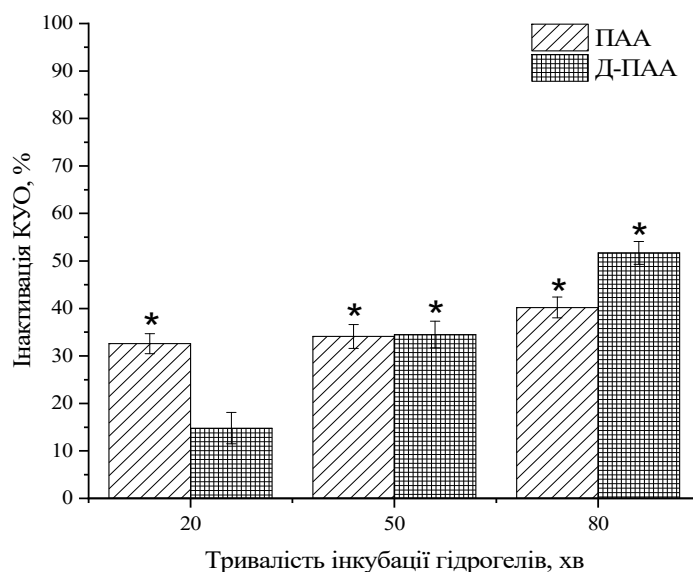


Рис. 3. Комплексна бактерицидна дія світла 600 нм дозою 5 Дж/мл (0,1 Дж/с) та ТС у гідрогелях ПАА та Д-ПАА на суспензію *S. aureus* за різної тривалості експозиції 20, 50, 80 хв ($m \pm SD$, $n = 3$, $*p < 0,05$)

Подальше зростання тривалості інкубації до 80 хв забезпечує збільшення бактерицидного ефекту до 50 % для Д-ПАА. Отже, з часом гідрогель Д-ПАА з ТС здатен формувати значно вищу концентрацію фотосенсибілізатора в розчині ніж ПАА. Таких показників можна дося-

гти за рахунок вищої сорбційної здатності та швидкості дифузії ТС зі структури гідрогелю.

Світло 600 нм сприяє зниженню кількості мікроорганізмів на 25 %. Це пояснюємо присутністю у бактеріальних клітинах похідних порфіринів, що мають декілька максимумів поглинання [26]. Фотоінактивація мікроор-

ганізмів довгохвильовим світлом передбачає присутність таких молекул у достатній кількості для забезпечення необхідного ефекту [27]. Якщо ж концентрація низька, то необхідні значні дози опромінення, що можуть сягати сотень джоулів [28]. Такі енергії негативно впливають на тканини, викликаючи їхній нагрів, порушення функціонування клітин, що призводить до апоптозу та некрозу. Отже, зазначений підхід не є ефективним за інактивзації мікроорганізмів у ранах.

Застосування навіть незначних кількостей фотосенсибілізаторів підвищує бактерицидний ефект довгохвильового світла. Ми виявили: концентрація ТС, що дифундує з гідрогелів, достатня для зниження КУО *S. aureus* до 50 % за дози опромінення 5 Дж/мл. За час інкубування гідрогелів у суспензії бактерій максимальна концентрація ТС становить 3,5–4 мкг/мл. Цієї кількості недостатньо для забезпечення токсичного ефекту на мікроорганізми та тканини людини, але за опромінення 600 нм відбувається значне зниження концентрації КУО. Отже, комбінацію гідрогелю Д-ПАА з ТС можна використовувати для інактивзації *S. aureus*.

Висновки. Результати адсорбції та десорбції ТС із гідрогелів ПАА та Д-ПАА вказують на кращі характеристики ємності та швидкості дифузії фотосенсибілізатора з Д-ПАА на 30 %. Інкубування гідрогелів з ТС у суспензії *Staphylococcus aureus* протягом 80 хв й опроміненням світлом 600 нм дозою 5 Дж/мл сприяє зниженню кількості КУО до 50 %. Отже, систему Д-ПАА з ТС у поєднанні зі світлом 600 нм можна використовувати з метою інактивзації *S. aureus*.

Список використаних джерел

1. Falanga V. Chronic Wounds: Pathophysiologic and Experimental Considerations / V. Falanga // Journal of Investigative Dermatology. – 1993. – Vol. 100(5). – P. 721-725.
2. Powers JG, Higham C, Broussard K, Phillips TJ. Wound healing and treating wounds: Chronic wound care and management / J.G. Powers, C. Higham, K. Broussard, T.J. Phillips // Journal of the American Academy of Dermatology. – 2016. – Vol. 74(4). – P. 607-626.
3. Edwards R, Harding K. Bacteria and wound healing / R. Edwards, K. Harding // Current Opinion in Infectious Diseases. – 2004. – Vol. 17(2). – P. 91-96.
4. Negut I, Grumezescu V, Grumezescu AM. Treatment Strategies for Infected Wounds / I. Negut, V. Grumezescu, A.M. Grumezescu // Molecules. – 2018. – Vol. 23(9). – P. 2392.
5. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance / J. Davies, D. Davies // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2010. – Vol. 74(3). – P. 417-433.
6. Cieplik F, Deng D, Crielaard W, Buchalla W, Hellwig E, Al-Ahmad A, Maisch T. Antimicrobial photodynamic therapy – what we know and what we don't / F. Cieplik, D. Deng, W. Crielaard, W. Buchalla, E. Hellwig, A. Al-Ahmad, T. Maisch // Critical Reviews in Microbiology. – 2018. – Vol. 44(5). – P. 571-589.
7. Walter AB, Simpson J, Jenkins JL, Skaar EP, Jansen ED. Optimization of optical parameters for improved photodynamic therapy of *Staphylococcus aureus* using endogenous coproporphyrin III / A.B. Walter, J. Simpson, J.L. Jenkins, E.P. Skaar, E.D. Jansen // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2020. – Vol. 29. – P. 101624.
8. Grinholc M, Szramka B, Olender K, Graczyk A. Bactericidal effect of photodynamic therapy against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain with the use of various porphyrin photosensitizers / M. Grinholc, B. Szramka, K. Olender, A. Graczyk // Acta Biochimica Polonica. – 2007. – Vol. 54(3). – P. 665-670.
9. Sabino CP, Wainwright M, Dos Anjos C, Sellera FP, Baptista MS, Lincopan N, Ribeiro MS. Inactivation kinetics and lethal dose analysis of antimicrobial blue light and photodynamic therapy / C.P. Sabino, M. Wainwright, C. Dos Anjos, F.P. Sellera, M.S. Baptista, N. Lincopan, M.S. Ribeiro // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2019. – Vol. 28. – P. 186-191.
10. Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, Saczko J, Kędzińska E, Knap-Czop K, Kotlińska J, Michel O, Kotowski K, Kulbacka J. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations / S. Kwiatkowski, B. Knap, D. Przystupski, J. Saczko, E. Kędzińska, K. Knap-Czop, J. Kotlińska, O. Michel, K. Kotowski, J. Kulbacka // Biomedicine and Pharmacotherapy. – 2018. – Vol. 106. – P. 1098-1107.
11. Gao W, Zhang Y, Zhang Q, Zhang L. Nanoparticle-Hydrogel: A Hybrid Biomaterial System for Localized Drug Delivery / W. Gao, Y. Zhang, Q. Zhang, L. Zhang // Annals of Biomedical Engineering. – 2016. – Vol. 44(6). – P. 2049-2061.
12. Wang W, Lu K, Yu C, Huang Q, Du Y. Nano-drug delivery systems in wound treatment and skin regeneration / W. Wang, K. Lu, C. Yu, Q. Huang, Y. Du // Journal of Nanobiotechnology. – 2019. – Vol. 17(1). – P. 82.
13. Wang Y, Cheetham A, Angacian G, Su H, Xie L, Cui H. Peptide-drug conjugates as effective prodrug strategies for targeted delivery

/ Y. Wang, A. Cheetham, G. Angacian, H. Su, L. Xie, H. Cui // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2017. – Vol. 110-111. – P. 112-126.

14. Narayanaswamy R, Torchilin V. Hydrogels and Their Applications in Targeted Drug Delivery / R. Narayanaswamy, V. Torchilin // Molecules. – 2019. – Vol. 24(3). – P. 603.

15. Francesko A, Petkova P, Tzanov T. Hydrogel Dressings for Advanced Wound Management / A. Francesko, P. Petkova, T. Tzanov // Current Medicinal Chemistry. – 2018. – Vol. 25(41). – P. 5782-5797.

16. Zhao X, Wu H, Guo B, Dong R, Qiu Y, Ma PX. Antibacterial antioxidant electroactive injectable hydrogel as self-healing wound dressing with hemostasis and adhesiveness for cutaneous wound healing / X. Zhao, H. Wu, B. Guo, R. Dong, Y. Qiu, P.X. Ma // Biomaterials. – 2017. – Vol. 122. – P. 34-47.

17. Abrahamse H, Hamblin R. New photosensitizers for photodynamic therapy / H. Abrahamse, R. Hamblin // Biochemical Journal. – 2016. – Vol. 473(4). – P. 347-364.

18. Ding C, Zhang F, Gao Y, Li Y, Cheng D, Wang J, Mao L. Antibacterial Photodynamic Treatment of *Porphyromonas gingivalis* with Toluidine Blue O and a Non-Laser Red Light Source Enhanced by Dihydroartemisinin / C. Ding, F. Zhang, Y. Gao, Y. Li, D. Cheng, J. Wang, L. Mao // Photochemistry and Photobiology. – 2021. – Vol. 97(2). – P. 377-384.

19. Shen J, Liang Q, Su G, Zhang Y, Wang Z, Baudouin C, Labbé A. In Vitro Effect of Toluidine Blue Antimicrobial Photodynamic Chemotherapy on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* Isolated from Ocular Surface Infection / J. Shen, Q. Liang, G. Su, Y. Zhang, Z. Wang, C. Baudouin, A. Labbé // Translational Vision Science and Technology. – 2019. – Vol. 8(3). – P. 45.

20. Su G, Wei Z, Wang L, Shen J, Baudouin C, Labbé A, Liang Q. Evaluation of Toluidine Blue-Mediated Photodynamic Therapy for Experimental Bacterial Keratitis in Rabbits / G. Su, Z. Wei, L. Wang, J. Shen, C. Baudouin, A. Labbé, Q. Liang // Translational Vision Science and Technology. – 2020. – Vol. 9(3). – P. 13.

21. Chen C, Hsieh C, Tsai T, Yang J, Chen C. Optimization and Evaluation of a Chitosan/Hydroxypropyl Methylcellulose Hydrogel Containing Toluidine Blue O for Antimicrobial Photodynamic Inactivation / C. Chen, C. Hsieh, T. Tsai, J. Yang, C. Chen // International Journal of Molecular Sciences. – 2015. – Vol. 16. – P. 20859-20872.

22. Mofazzal Jahromi MA, Sahandi Zangabad P, Moosavi Basri SM, Sahandi Zangabad K, Ghamarypour A, Aref AR, Karimi M, Hamblin MR. Nanomedicine and advanced technologies for burns: Preventing infection and facilitating wound healing / M.A. Mofazzal Jahromi, P. Sahandi Zangabad, S.M. Moosavi Basri, K. Sahandi Zangabad, A. Ghamarypour, A.R. Aref, M. Karimi, M.R. Hamblin // Advanced drug delivery reviews. – 2018. Vol. 123. P. 33-64.

23. Nadtoka O, Kutsevol N, Krysa V, Krysa B. Hybrid polyacrylamide hydrogels: Synthesis, properties and prospects of application / O. Nadtoka, N. Kutsevol, V. Krysa, B. Krysa // Molecular Crystals and Liquid Crystals. – 2018. – Vol. 672(1). – P. 1-10.

24. Ghorbani J, Rahban D, Aghamiri S, Teymouri A, Bahador A. Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: an overview / J. Ghorbani, D. Rahban, S. Aghamiri, A. Teymouri, A. Bahador // Laser Therapy. – 2018. – Vol. 24(7). – P. 293-302.

25. Nadtoka O, Virych P, Kutsevol N. Hydrogels Loaded with Methylene Blue: Sorption-Desorption and Antimicrobial Photoactivation Study / O. Nadtoka, P. Virych, N. Kutsevol // International Journal of Polymer Science. – 2020. – Vol. 2020. – P. 6.

26. Fyrestam J. Porphyrins and heme in microorganisms – Porphyrin content and its relation to phototherapy and antimicrobial treatments in vivo and in vitro / J. Fyrestam. – Stockholm: Stockholm University. – 2017. – 88 p.

27. Amos-Tautua BM, Songca SP, Oluwafemi OS. Application of Porphyrins in Antibacterial Photodynamic Therapy / B.M. Amos-Tautua, S.P. Songca, O.S. Oluwafemi // Molecules (Basel, Switzerland). – 2019. – Vol. 24(13). – P. 2456.

28. Hessling M, Spellerberg B, Hoenes K. Photoinactivation of bacteria by endogenous photosensitizers and exposure to visible light of different wavelengths – a review on existing data / M. Hessling, B. Spellerberg, K. Hoenes // FEMS Microbiology Letters. – 2017. – Vol. 364(2). – P. 270.

References (Scopus)

1. Falanga V. Chronic Wounds: Pathophysiologic and Experimental Considerations / Invest Dermatol, 1993;100(5):721-725. doi:10.1111/1523-1747.ep12472373
2. Powers JG, Higham C, Broussard K, Phillips TJ. Wound healing and treating wounds: Chronic wound care and management. J Am Acad Dermatol, 2016;74(4):607-626. doi:10.1016/j.jaad.2015.08.070
3. Edwards R, Harding K. Bacteria and wound healing. Curr Opin Infect Dis, 2004;17(2): 91-96. doi:10.1097/00001432-200404000-00004
4. Negut I, Grumezescu V, Grumezescu AM. Treatment Strategies for Infected Wounds. Molecules, 2018;23(9):2392. doi:doi.org/10.3390/molecules23092392
5. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol Mol Biol Rev, 2010;74(3):417-433. doi:10.1128/MMBR.00016-10
6. Cieplik F, Deng D, Crielaard W, Buchalla W, Hellwig E, Al-Ahmad A, Maisch T. Antimicrobial photodynamic therapy – what we know and what we don't. Crit Rev Microbiol, 2018;44(5):571-589. doi:10.1080/1040841X.2018.1467876
7. Walter AB, Simpson J, Jenkins JL, Skaar EP, Jansen ED. Optimization of optical parameters for improved photodynamic therapy of *Staphylococcus aureus* using endogenous coproporphyrin III. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2020;29: 101624. doi:10.1016/j.pdpdt.2019.101624
8. Grinholc M, Szramka B, Olender K, Graczyk A. Bactericidal effect of photodynamic therapy against methicillin-resistant *Staphylococcus*

aureus strain with the use of various porphyrin photosensitizers. Acta Biochim Pol. 2007;54(3):665–670.

9. Sabino CP, Wainwright M, Dos Anjos C, Sellera FP, Baptista MS, Lincopan N, Ribeiro MS. Inactivation kinetics and lethal dose analysis of antimicrobial blue light and photodynamic therapy. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2019;28:186-191. doi:10.1016/j.pdpdt.2019.08.022

10. Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, Saczko J, Kędzińska E, Knap-Czop K, Kotlińska J, Michel O, Kotowski K, Kulbacka J. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. Biomed Pharmacother. 2018;106:1098-1107. doi:10.1016/j.biopha.2018.07.049

11. Gao W, Zhang Y, Zhang Q, Zhang L. Nanoparticle-Hydrogel: A Hybrid Biomaterial System for Localized Drug Delivery. Ann Biomed Eng. 2016;44(6):2049-2061. doi:10.1007/s10439-016-1583-9

12. Wang W, Lu K, Yu C, Huang Q, Du Y. Nano-drug delivery systems in wound treatment and skin regeneration. J Nanobiotechnology. 2019;17(1):82. doi:10.1186/s12951-019-0514-y

13. Wang Y, Cheetham A, Angacian G, Su H, Xie L, Cui H. Peptide-drug conjugates as effective prodrug strategies for targeted delivery. Adv Drug Deliv Rev. 2017;110-111:112-26. doi:10.1016/j.addr.2016.06.015

14. Narayanaswamy R, Torchilin V. Hydrogels and Their Applications in Targeted Drug Delivery. Molecules. 2019;24(3):603. doi:10.3390/molecules24030603

15. Francesko A, Petkova P, Tzanov T. Hydrogel Dressings for Advanced Wound Management. Curr Med Chem. 2018;25(41):5782-5797. doi:10.2174/0929867324666170920161246

16. Zhao X, Wu H, Guo B, Dong R, Qiu Y, Ma PX. Antibacterial antioxidant electroactive injectable hydrogel as self-healing wound dressing with hemostasis and adhesiveness for cutaneous wound healing. Biomaterials. 2017;122:34-47. doi:10.1016/j.biomaterials.2017.01.011

17. Abrahamse H, Hamblin R. New photosensitizers for photodynamic therapy. Biochem J. 2016;473(4):347-364. doi:10.1042/BJ20150942

18. Ding C, Zhang F, Gao Y, Li Y, Cheng D, Wang J, Mao L. Antibacterial Photodynamic Treatment of Porphyromonas gingivalis with Toluidine Blue O and a NonLaser Red Light Source Enhanced by Dihydroartemisinin. Photochem Photobiol. 2021;97(2): 377-384. doi:10.1111/php.13333

19. Shen J, Liang Q, Su G, Zhang Y, Wang Z, Baudouin C, Labbé A. In Vitro Effect of Toluidine Blue Antimicrobial Photodynamic Chemotherapy on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* Isolated from Ocular Surface Infection. Transl Vis Sci Technol. 2019;8(3): 45. doi:10.1167/tvst.8.3.45

20. Su G, Wei Z, Wang L, Shen J, Baudouin C, Labbé A, Liang Q. Evaluation of Toluidine Blue-Mediated Photodynamic Therapy for Experimental Bacterial Keratitis in Rabbits. Transl Vis Sci Technol. 2020;9(3):13. doi:10.1167/tvst.9.3.13

21. Chen C, Hsieh C, Tsai T, Yang J, Chen C. Optimization and Evaluation of a Chitosan/Hydroxypropyl Methylcellulose Hydrogel Containing Toluidine Blue O for Antimicrobial Photodynamic Inactivation. Int J Mol Sci. 2015;16:20859-20872. doi:10.3390/ijms160920859

22. Mofazzal Jahromi MA, Sahandi Zangabad P, Moosavi Basri SM, Sahandi Zangabad K, Ghamarypour A, Aref AR, Karimi M, Hamblin MR. Nanomedicine and advanced technologies for burns: Preventing infection and facilitating wound healing. Advanced drug delivery reviews. 2018;123: 33–64. doi:10.1016/j.addr.2017.08.001

23. Nadtoka O, Kutsevol N, Krysa V, Krysa B. Hybrid polyacrylamide hydrogels: Synthesis, properties and prospects of application. Molecular Crystals and Liquid Crystals, 2018;672(1): 1-10. doi:10.1080/15421406.2018.1542089

24. Ghorbani J, Rahban D, Aghamiri S, Teymouri A, Bahador A. Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: an overview. Laser Ther. 2018;24(7):293-302. doi:10.5978/islsm.27_18-RA-01

25. Nadtoka O, Virych P, Kutsevol N. Hydrogels Loaded with Methylene Blue: Sorption-Desorption and Antimicrobial Photoactivation Study. Int J Polym Sci. 2020;2020: 6. doi:10.1155/2020/9875290

26. Fyrestam J. Porphyrins and heme in microorganisms – Porphyrin content and its relation to phototherapy and antimicrobial treatments in vivo and in vitro. 2017. Stockholm: Stockholm University, 88p.

27. Amos-Tautua BM, Songca SP, Oluwafemi OS. Application of Porphyrins in Antibacterial Photodynamic Therapy. Molecules (Basel, Switzerland). 2019;24(13):2456. doi:10.3390/molecules24132456

28. Hessling M, Spellerberg B, Hoenes K. Photo inactivation of bacteria by endogenous photosensitizers and exposure to visible light of different wave lengths – are view on existing data. FEMS Microbiol Lett. 2017;364(2):fnw270. doi:10.1093/femsle/fnw270

Надійшла до редколегії 3.09.2021
Отримано виправлений варіант 5.10.2021
Підписано до друку 5.10.2021

Received in the editorial 3.09.2021
Received a revised version on 5.10.2021
Signed in the press on 5.10.2021

П. Вирьч, канд. биол. наук,

О. Надтока, канд. хим. наук,

Н. Куцевол, д-р хим. наук

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

КОМБИНАЦИЯ ГИДРОГЕЛЯ, ТОЛУИДИНОВОГО СИНЕГО И СВЕТА 600 НМ ДЛЯ ИНАКТИВАЦИИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN VITRO

Нарушение целостности кожных покровов сопровождается бактериальной контаминацией новообразованной раны. Средства, направленные на предупреждение и лечение инфекции открытых ран, предусматривают минимизацию загрязнения поврежденных тканей и ускорения их регенерации. С появлением антибиотикорезистентных штаммов начался поиск альтернативных способов инактивации микроорганизмов. Использование фотосенсибилизаторов с максимумами поглощения в красной и инфракрасной области спектра позволяет минимизировать световую нагрузку на ткани, сохраняя при этом необходимые бактерицидные эффекты. Целью исследований является выяснение эффективности сочетания гидрогелей с толуидиновым синим (ТС) и облучения светом 600 нм для ингибирования *in vitro* роста *Staphylococcus aureus*. После 3 ч инкубации гидрогелей с ТС в водном растворе не наблюдается формирование равновесного состояния. В течение этого времени происходит десорбция 57 % от общего количества ТС с гидрогеля полиакриламид (ПАА) и 43 % – декстран-полиакриламид (Д-ПАА). Скорость процесса зависит от типа полимера. Десорбция проходит на 30 % быстрее для Д-ПАА чем ПАА. Облучение суспензии *S. aureus* светом 600 нм способствует снижению количества КОЕ на 25 % при дозе выше 4 Дж/мл. По короткой экспозиции гидрогелей (20 мин) в суспензии микроорганизмов и их облучению светом 600 нм происходит снижение количества КОЕ на 33 % при использовании ПАА и 15 % – Д-ПАА. После 50 мин эффективность для ПАА практически не меняется, а для Д-ПАА показатель составляет 35 %. Дальнейшее увеличение продолжительности инкубации до 80 мин обеспечивает увеличение бактерицидного эффекта до 50 % для Д-ПАА. Таким образом, система Д-ПАА с ТС в сочетании со светом 600 нм может использоваться с целью инактивации *S. aureus*.

Ключевые слова: фотоинактивация бактерий, толуидиновый синий, полиакриламид, декстран-полиакриламид, фотодинамическая терапия.

P. Virych, PhD,

O. Nadtoka, PhD,

N. Kutsevol, Dr Hab.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

COMBINATION OF HYDROGEL-TOLUIDINE BLUE AND LIGHT 600 NM FOR INACTIVATION *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN VITRO

Skin damage is accompanied by bacterial infection of the wound. Different materials are used for accelerate tissue regeneration and minimize bacterial contamination. Also it is prevent the penetration of bacteria to damaged tissues. After the emergence of antibiotic-resistant strains of microorganisms began the search for alternative means of their inactivation. Photosensitizers are used for this purpose. Their maxima of optical absorbance are in the red and infrared regions. These of such substances provides powerful bactericidal effects, but with low toxicity to surrounding tissues. The aim of the investigation is to determine the effectiveness of combining hydrogels with toluidine blue and irradiation by light of 600 nm to inhibit the *in vitro* of *Staphylococcus aureus* growth. Equilibrium is not formed after incubation of hydrogels with toluidine blue after 3 h in aqueous solution. During this time, 57 and 43 % of the photosensitizer is desorbed from the hydrogels PAA and D-PAA, respectively. Process rate depends on the type of polymer. Desorption of TB from D-PAA is 30% faster. Irradiation of the suspension of *S. aureus* by light of 600 nm reduced the CFU amount by 25 % at a dose more than 4 J/ml. Short incubation (20 min) of the PAA and D-PAA hydrogels in the bacterial suspension and light irradiation (600 nm), the amount of CFU are reduced by 33% and 15 %, respectively. Increasing the incubation time of PAA does not increase the bactericidal effect. Exposure of 80 min D-PAA with TB in a suspension of *S. aureus*, followed by light irradiation provides inactivation of 50 % CFU. Thus, the D-PAA system with toluidine blue in combination with 600 nm light can be used to inactivate *S. aureus*.

Keywords: bacteria photoinactivation, toluidine blue, polyacrylamide, dextran-polyacrylamide, photodynamic therapy.