



Stanowisko do badania efektywności antyseptyki fotodynamicznej in vitro

Wstęp

Efekt fotodynamiczny jest wykorzystywany w nieinwazyjnej metodzie terapeutycznej znanej jako terapia fotodynamiczna (PDT). Polega on na selektywnym niszczeniu komórek nowotworowych lub drobnoustrojów poprzez aktywację fotouczulacza światłem o odpowiedniej długości fali, co prowadzi do wytworzenia reaktywnych form tlenu. Powstałe w ten sposób formy reaktywne prowadzą do uszkodzenia struktur komórkowych.

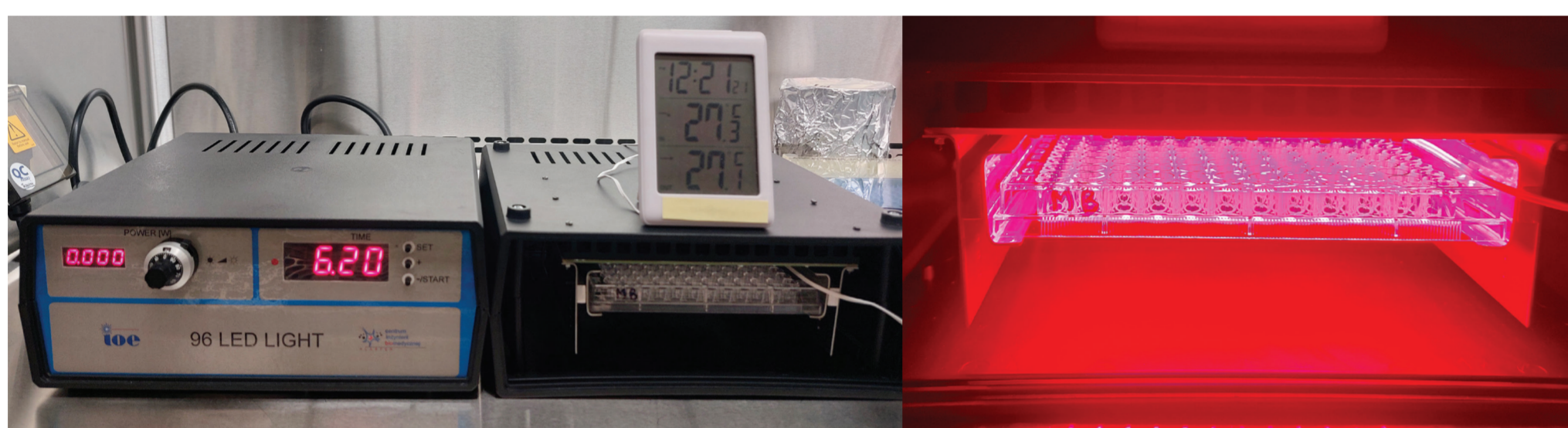
Jednym z zastosowań tej metody jest przeciwdrobnoustrojowa chemioterapia fotodynamiczna (PACT), której celem są głównie bakterie lub grzyby chorobotwórcze. Jedną z możliwości jakie daje PACT jest zastąpienie stosowania antybiotyków, na które coraz częściej drobnoustroje stają się odporne.

Celem poniżej przedstawionych badań było opracowanie stanowiska laboratoryjnego umożliwiającego ocenę efektywności przeciwbakteryjnej wybranych fotouczulaczy aktywowanych czerwonym światłem emitowanym ze źródła LED w warunkach in vitro przeznaczonych do zastosowań w antyseptyce.

Materiały i metody

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem referencyjnego szczepu bakteryjnego chorobotwórczego gatunku *Staphylococcus aureus* ATCC 35556. Wybrany gatunek jest jednym z najczęstszych czynników etiologicznych w zakażeniach skóry oraz w zakażeniach ran w chirurgii ogólnej i urazowej.

Wykorzystanymi fotouczulaczami były błękit metylenowy i błękit toluidynowy. Ich aktywację prowadzono przy użyciu czerwonego światła emitowanego przez oświetlacz 96 LED LIGHT opracowany w dwóch wersjach opartych na diodach o długości fali równej 635 nm lub 655 nm.



Oświetlacz 96 LED LIGHT

Badania przeprowadzono w trzech etapach:

Etap I – Badanie wpływu fotouczulaczy na przeżywalność komórek *S. aureus*

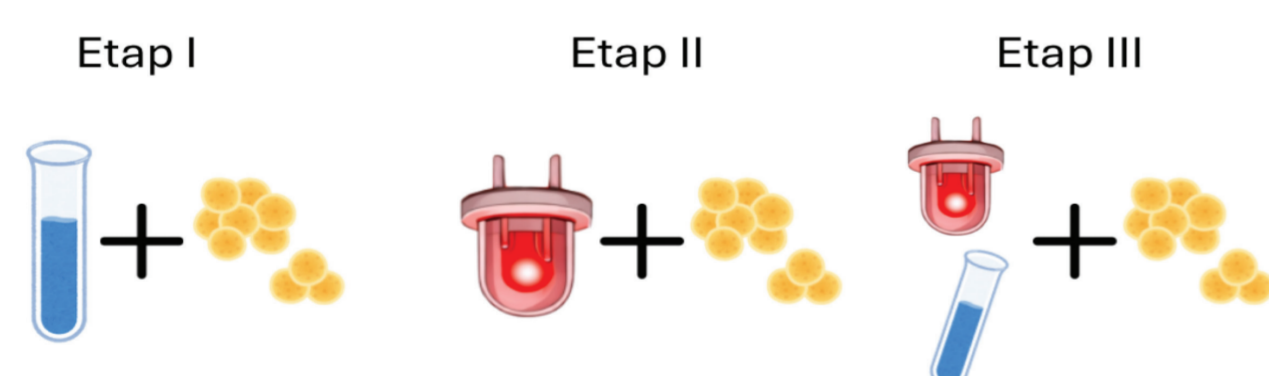
Zawiesiny bakterii inkubowano przez 20 minut w całkowitej ciemności z fotouczulaczami w wybranych stężeniach. Po zakończeniu inkubacji próbki poddawano ocenie mikrobiologicznej przy użyciu klasycznej metody rozcieńczeń i posiewu na płytki, a następnie zliczono kolonie bakteryjne.

Etap II – Badanie wpływu czerwonego światła LED na przeżywalność komórek *S. aureus*

Zawiesinę bakterii poddawano naświetlaniu czerwonym światłem LED o wybranych wartościach powierzchniowej gęstości energii. Bezpośrednio po naświetlaniu próbki były poddawane ilościowej analizie mikrobiologicznej oraz zliczeniu kolonii bakteryjnych. Ponadto wykonano ocenę morfologii komórek bakteryjnych przed i po naświetlaniu za pomocą mikroskopu optycznego.

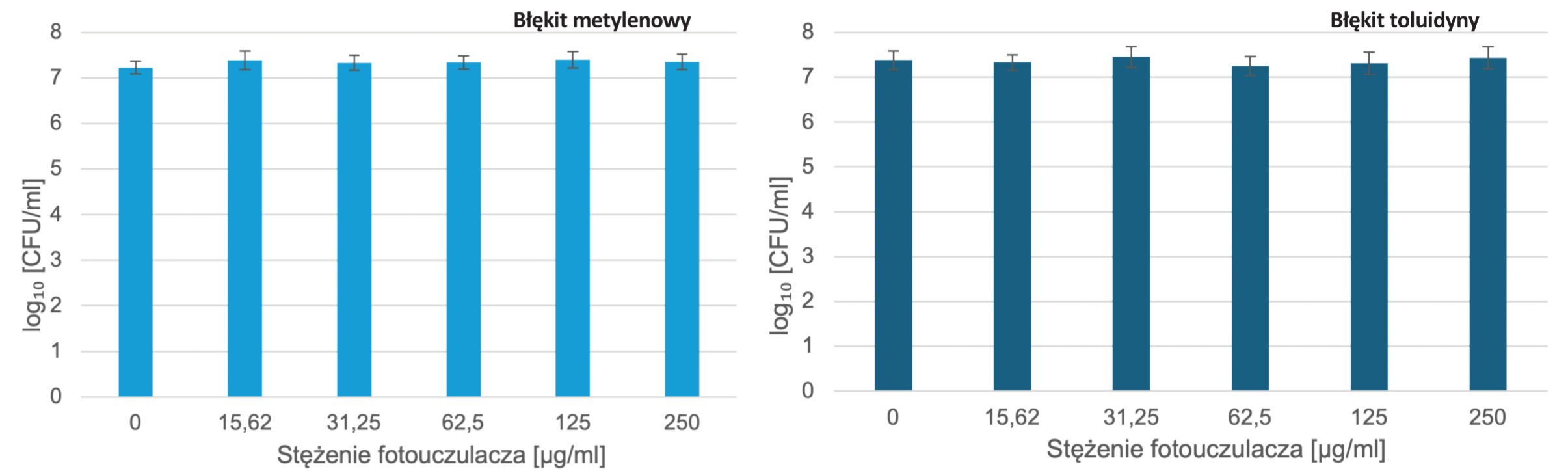
Etap III – Badanie wpływu wybranych fotouczulaczy aktywowanych czerwonym światłem emitowanym ze źródła LED na przeżywalność komórek *S. aureus*

Zawiesinę bakterii inkubowano z fotouczulaczami przez 20 minut w całkowitej ciemności, a następnie naświetlano czerwonym światłem emitowanym ze źródła LED o wybranych wartościach powierzchniowej gęstości energii. Bezpośrednio po naświetlaniu wszystkie próbki były poddawane ilościowej analizie mikrobiologicznej za pomocą klasycznej metody rozcieńczeń i posiewu na płytki, następnie zliczono kolonie bakteryjne.



Etap I

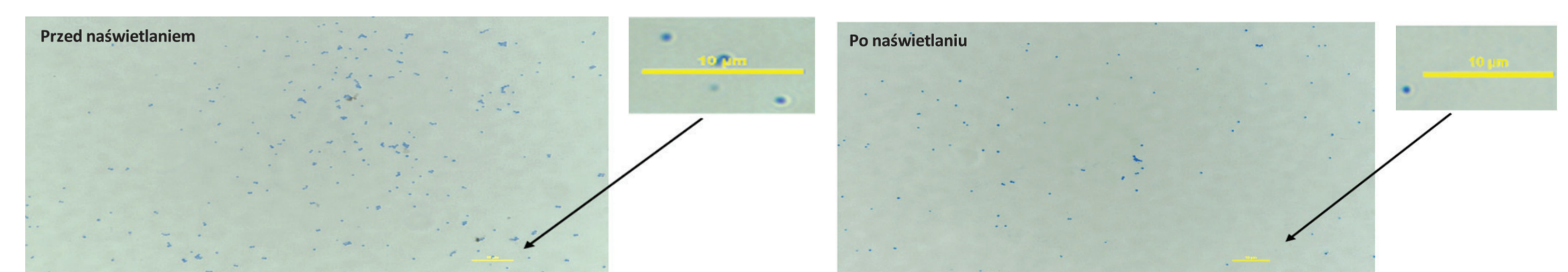
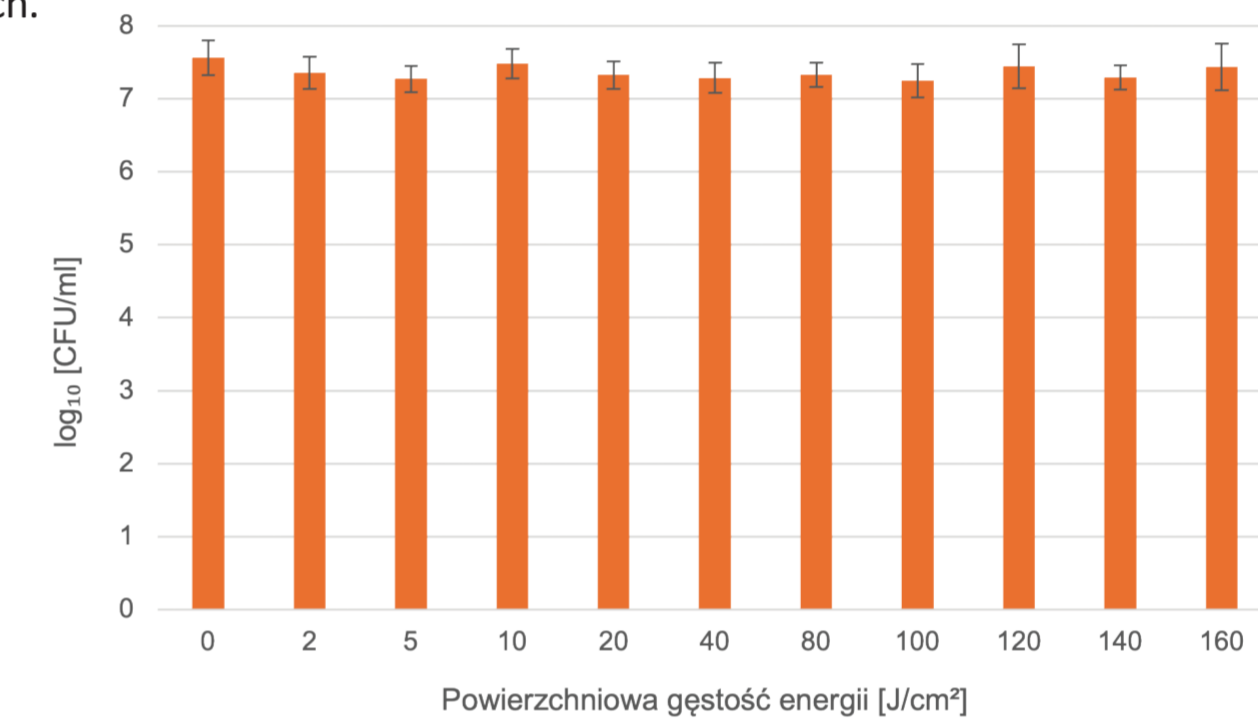
Zastosowanie samych fotouczulaczy, bez aktywacji światłem nie wpłynęło znacząco na liczbę żywych hodowlanych komórek *S. aureus* w zbadanym zakresie stężeń. Może to również świadczyć o braku bezpośredniego wpływu toksycznego tych substancji na bakterie użyte w badaniach.



Etap II

Wzrost wartości powierzchniowej gęstości energii nie miał istotnego wpływu na redukcję liczby żywych hodowlanych komórek *S. aureus*, co świadczy o braku istotnego efektu bakteriobójczego pod wpływem oddziaływania samego czerwonego światła emitowanego ze źródła LED.

Przeprowadzona dodatkowo analiza mikroskopowa nie wykazała istotnego wpływu światła czerwonego LED na kształt, wielkość i układ komórek bakteryjnych.

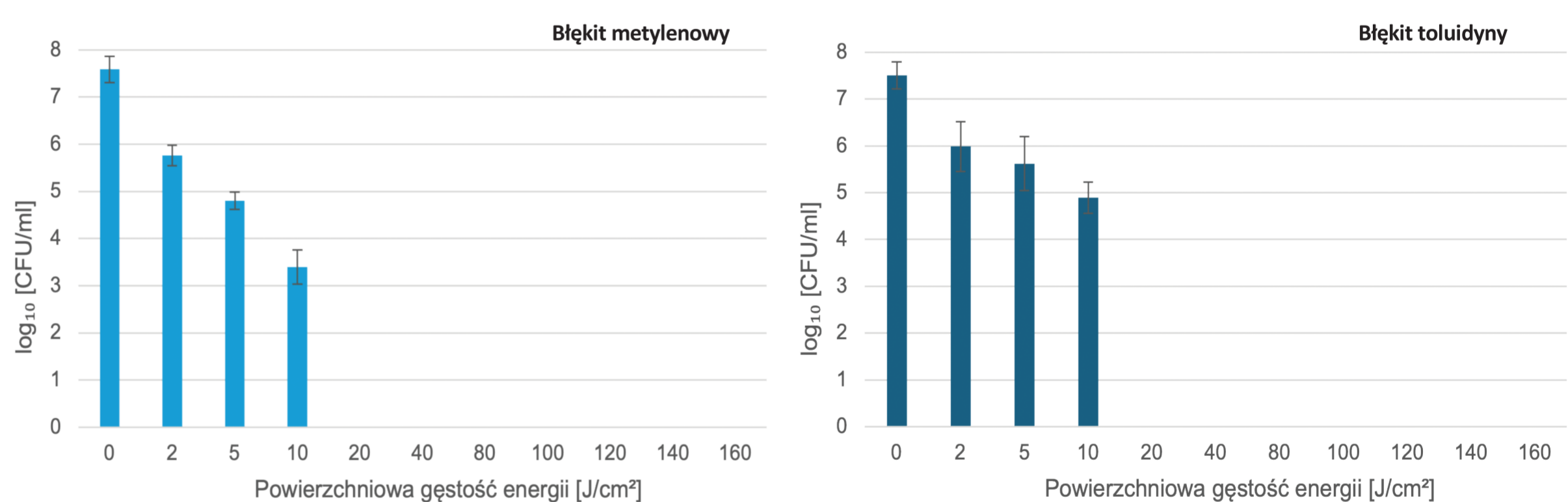


Zdjęcia przedstawiają przykładową analizę mikroskopową wykonaną dla błękitu metylenowego.

Etap III

Zastosowanie fotouczulacza w połączeniu z naświetlaniem światłem czerwonym LED powodowało spadek liczby żywych hodowlanych komórek *S. aureus*.

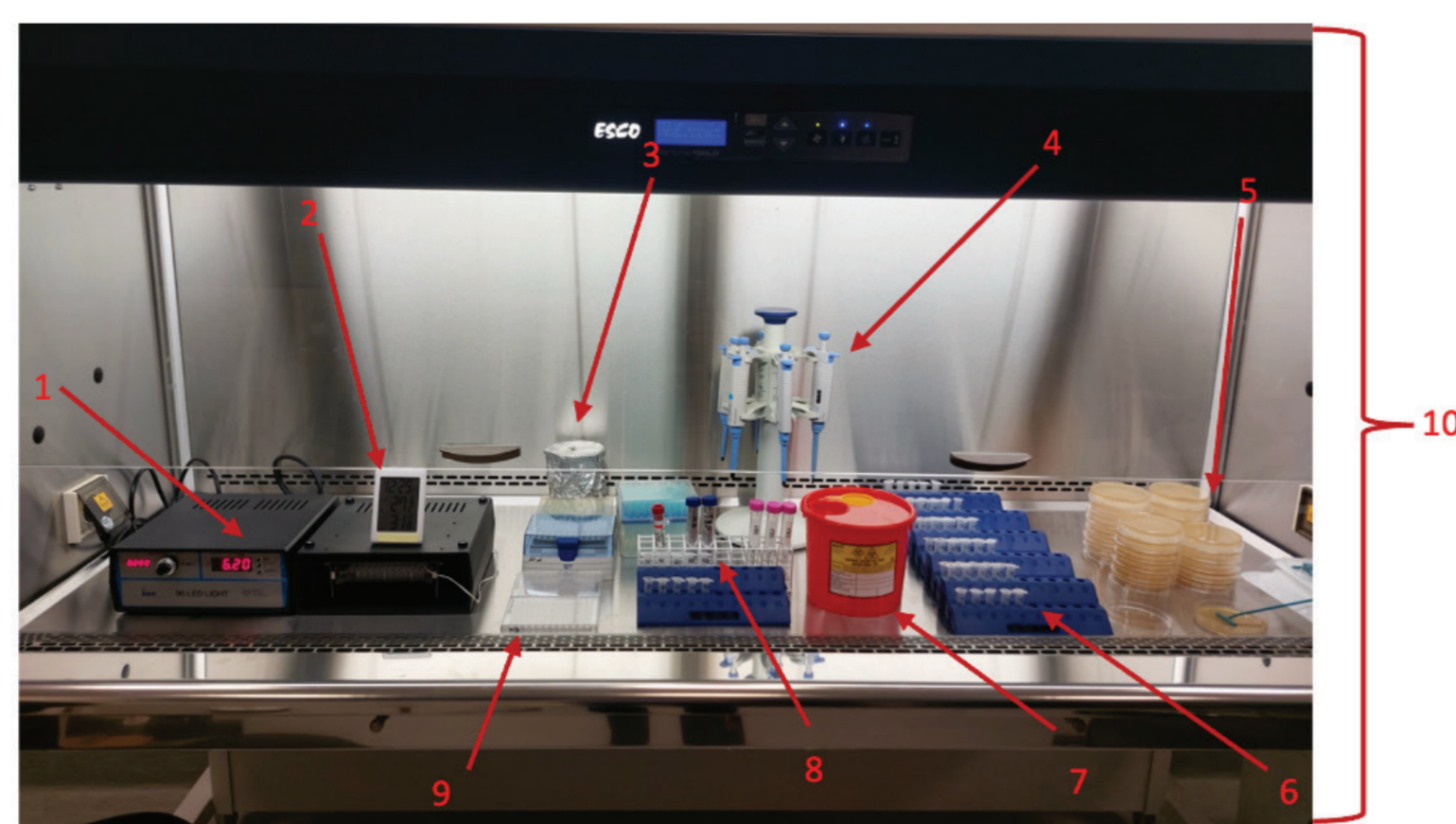
W przypadku MB największy stopień redukcji liczby żywych hodowlanych drobnoustrojów wynoszący 4,20 log uzyskano dla wartości powierzchniowej gęstości energii wynoszącej 10 J/cm². W przypadku TBO największy stopień redukcji liczby żywych hodowlanych drobnoustrojów wynoszący 2,61 log uzyskano dla wartości powierzchniowej gęstości energii wynoszącej 10 J/cm².



Wyniki

Opracowane stanowisko badawcze zostało zorganizowane w obrębie komory laminarnej klasy BSL-2.

- Oświetlacz LED
- Termometr
- Próbówki typu Eppendorf
- Pipety automatyczne
- Szalki Petriego z podłożem agarowym
- Przygotowane rozcieńczenia zawiesiny bakteryjnej
- Pojemnik na odpady zakaźne
- Przygotowane stocki fotouczulaczy oraz zawiesina bakteryjna
- 96-dółkowa płytka
- Komora laminarna



Wnioski

Opracowane stanowisko laboratoryjne umożliwiło przeprowadzenie wstępnej i powtarzalnej oceny skuteczności przeciwdrobnoustrojowej chemioterapii fotodynamicznej wobec *S. aureus* w warunkach in vitro.

Zastosowanie samych fotouczulaczy w badanym zakresie stężeń, jak również ekspozycja próbek wyłącznie na czerwone światło LED, nie powodowały istotnej redukcji liczby żywych hodowlanych komórek *S. aureus*.

Największą skuteczność inaktywacji bakterii uzyskano w warunkach jednoczesnego zastosowania fotouczulacza oraz naświetlania światłem LED, przy czym błękit metylenowy wykazywał wyraźnie wyższą aktywność fotodynamiczną niż błękit toluidynowy.

Przeprowadzone badania stanowią podstawę do dalszego rozwijania opracowanego stanowiska badawczego, w szczególności poprzez rozszerzenie analiz o inne gatunki drobnoustrojów, modele biofilmu bakteryjnego, zróżnicowane parametry naświetlania oraz ocenę bezpieczeństwa metody PACT wobec komórek eukariotycznych.

Specjalność: **OPTOELEKTRONIKA DLA INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ**