

## ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО КРАСНОГО ЛАЗЕРА НА РОСТ ШТАММОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* И СЕНСИБИЛИЗИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ ФОТОДИТАЗИНА

<sup>1</sup>Саратовский государственный медицинский университет им. В.И.Разумовского,

<sup>2</sup>Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

*Цель.* Исследовать влияние лазерного излучения красной области спектра на рост колоний метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного штаммов *Staphylococcus aureus*, а также изучить фотодинамический эффект фотосенсибилизатора фотодитазина. *Материалы и методы.* Определяли влияние света полупроводникового красного лазера ( $\lambda$  660 нм, 100 мВт/см<sup>2</sup>) в дозах 30, 60, 90 и 180 Дж/см<sup>2</sup> на рост колоний *S. aureus*. Время облучения — 5, 10, 15 и 30 мин. В отдельных сериях экспериментов бактериальные клетки предварительно сенсибилизировали водным раствором фотодитазина в концентрации  $5 \times 10^{-6}$  М. *Результаты.* Установлено, что излучение красного лазера вызывало отчетливое подавление бактериального роста. Этот эффект на стандартном штамме *S. aureus* проявлялся только при использовании относительно высоких доз облучения (180 Дж/см<sup>2</sup>). Фоточувствительность метициллин-резистентного штамма оказалась значительно выше: бактериостатическое действие красного света отмечалось уже при дозе 60 Дж/см<sup>2</sup>. Предварительная обработка бактериальных клеток фотодитазином заметно усиливала ростингибирующий эффект лазерного света.

Журн. микробиол., 2017, № 2, С. 34—37

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, лазерное излучение, фотодитазин

G.E.Brill<sup>1</sup>, A.V.Egorova<sup>1</sup>, I.O.Bugaeva<sup>1</sup>, G.V.Ponomarev<sup>2</sup>

## EFFECT OF LOW-INTENSITY RED LASER ON GROWTH OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AND SENSITIZING EFFECT OF PHOTODITAZIN

<sup>1</sup>Razumovsky Saratov State Medical University, <sup>2</sup>Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

*Aim.* Study the effect of laser emission in the red spectrum on growth of methicillin-sensitive and methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*, as well as photodynamic effect of photosensitizer photoditazin. *Materials and methods.* Effect of light of semiconductor red laser ( $\lambda$  660 nm, 100 mW/cm<sup>2</sup>) at 30, 60, 90 and 180 J/cm<sup>2</sup> on growth of *S. aureus* colonies was determined. Time of exposure — 5, 10, 15 and 30 minutes. In certain series of experiments bacterial cells were sensitized in advance by a water solution of photoditazin at a concentration of  $5 \times 10^{-6}$  M. *Results.* Red laser emission was established to cause a pronounced suppression of bacterial growth. This effect on standard *S. aureus* strain only took place during use of relatively high exposure doses (180 J/cm<sup>2</sup>). Photosensitivity of methicillin-resistant strain turned out to be significantly higher: bacteriostatic effect of red light was noted already at the dose of 60 J/cm<sup>2</sup>. Treatment of bacterial cells with photoditazin in advance significantly enhanced growth-inhibiting effect of laser light.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 2, P. 34—37

Key words: *Staphylococcus aureus*, laser emission, photoditazin

## ВВЕДЕНИЕ

Золотистый стафилококк является возбудителем многих заболеваний человека и до последнего времени остается наиболее частой причиной возникновения внутрибольничных инфекций [2, 4]. Особому риску подвергаются пациенты с ослабленной иммунной системой при несоблюдении персоналом больницы надлежащих санитарных правил. Лечение стафилококковых инфекций вызывает серьезные трудности, вследствие нарастающей лекарственной устойчивости возбудителя и появления метициллин-резистентных штаммов (MRSA) [1, 3, 5]. Последнее диктует необходимость изыскания новых немедикаментозных методов лечения стафилококковых поражений. В этом плане внимание исследователей привлекают различные виды низкоинтенсивного лазерного излучения. Однако считается, что бактериальные клетки мало чувствительны к свету красной области спектра.

Целью настоящей работы явилось изучение прямого бактериостатического действия на *S. aureus* низкоинтенсивного красного лазера и фотодинамического эффекта фотосенсибилизатора фотодитазина.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали клетки стандартного (метициллин-чувствительного, MSSA) и клинического (метициллин-резистентного, MRSA) штаммов *S. aureus* 209P, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии СГМУ им. В.И. Разумовского. Для культивирования бактерий использовали ГРМ-агар (ГНЦ ПМБ, Оболенск). Для облучения культур микроорганизмов использовали полупроводниковый лазер (EMRED Oy, Финляндия), генерирующий излучение красной области спектра ( $\lambda$  660 нм) в непрерывном режиме. Плотность мощности составляла 100 мВт/см<sup>2</sup>, время облучения — 5, 10, 15 и 30 мин. При этом суммарная энергетическая доза облучения составляла соответственно 30, 60, 90 и 180 Дж/см<sup>2</sup>. Для сенсибилизации бактериальных клеток использовали водный раствор фотодитазина (N-диметилглюкаминовая соль хлорина Е6) в концентрации  $5 \times 10^{-6}$  М (производитель ООО ВЕТА-ГРАНД, Москва). Фотосенсибилизатор был предоставлен проф. Г.В. Пономаревым (Москва). Пик поглощения молекулы фотодитазина совпадает с длиной волны используемого лазера. Для создания асептических условий полистирольный 96-луночный планшет для иммунологических исследований помещали в стерильный пластиковый корпус. Источник излучения располагали над ячейками планшета.

Бактериальную взвесь готовили в стерильном физиологическом растворе по международному оптическому стандарту мутности 5 ед. (ГИСК им. Л.А. Тарасевича); конечная концентрация составила  $10^3$  м.к./мл. Из разведения микроорганизмов  $10^4$  м.к./мл 0,1 мл взвеси вносили в 0,9 мл раствора фотосенсибилизатора и инкубировали в течение 30 мин без доступа света. Из конечного разведения, а также из раствора фотосенсибилизатора бактериальную взвесь в объеме 0,2 мл вносили в ячейки планшета. Облучение находящихся в ячейках бактериальных клеток проводили, последовательно увеличивая дозу. Из каждой ячейки высевали по 0,2 мл взвеси на чашки Петри с плотной питательной средой и равномерно распределяли по поверхности стерильным шпателем. Контролем служили взвеси бактерий, не обработанные фотосенсибилизатором и не подвергнутые облучению. Посевы контрольных и облученных микроорганизмов инкубировали в течение 48 часов при 37°C. Оценку

роста бактерий проводили путем подсчета числа колониеобразующих единиц (КОЕ). Все эксперименты проводили в пятикратных повторностях. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием U-теста Манна-Уитни. Достоверными считали различия средних при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Среднее количество колоний при росте метициллин-чувствительного штамма в контроле (без воздействия) составило  $373,6 \pm 46,2$ . После лазерного облучения в суммарной дозе 30, 60 и 90 Дж/см<sup>2</sup> количество колоний слегка уменьшалось, но эти изменения были статистически не достоверны ( $p > 0,1$ ). Однако фотовоздействие в дозе 180 Дж/см<sup>2</sup> вызывало уменьшение числа колоний до  $238,8 \pm 21,8$ , т.е. на 36% ( $p < 0,02$ ).

Иные закономерности были обнаружены при использовании метициллин-резистентного штамма золотистого стафилококка. Среднее количество колоний этого штамма в контроле составило  $320,6 \pm 69,9$ , что достоверно не отличалось от роста стандартного штамма ( $p > 0,5$ ). После облучения лазером в суммарной дозе 30 Дж/см<sup>2</sup> прослеживалась тенденция к угнетению клеточного роста ( $p > 0,05$ ). Увеличение дозы фотовоздействия приводило к отчетливому подавлению бактериального роста. Так, при использовании дозы 60 Дж/см<sup>2</sup> число колоний уменьшилось до  $143,2 \pm 19,6$  (на 55%,  $p < 0,05$ ), при 90 Дж/см<sup>2</sup> — до  $126,4 \pm 16,8$  (на 61%,  $p < 0,05$ ), при 180 Дж/см<sup>2</sup> — до  $107,2 \pm 14,8$  ( $p < 0,02$ ). То есть при максимальной дозе облучения, использованной в наших опытах, угнетение роста бактерий достигало 67%.

Следовательно, низкоинтенсивное лазерное излучение красной области спектра оказывает ингибирующее влияние на рост колоний *S. aureus*, причем этот эффект на стандартном штамме проявляется только при использовании относительно высоких доз облучения (180 Дж/см<sup>2</sup>). Фоточувствительность метициллин-резистентного штамма оказалась значительно выше: бактериостатическое действие красного света отмечалось уже при дозе 60 Дж/см<sup>2</sup>.

Далее мы определили, не влияет ли на рост стафилококков предварительная инкубация бактериальных клеток с фотосенсибилизатором фотодитазином. Как оказалось, этот препарат не оказывает существенного влияния на рост бактерий. Число колоний штамма MSSA при использовании фотодитазина в концентрации  $5 \times 10^{-6}$  М составляло  $338,8 \pm 36,0$  ( $p > 0,5$ ), штамма MRSA —  $296,4 \pm 63,1$  ( $p > 0,5$ ).

Следующим этапом нашей работы явилось изучение фотодинамического действия фотодитазина на *S. aureus*. С этой целью микробные клетки, предварительно обработанные фотосенсибилизатором, подвергались лазерному воздействию.

Опыты, проведенные со штаммом MSSA, подвергнутым действию фотодитазина, показали, что лазерное облучение уже в малой дозе (30 Дж/см<sup>2</sup>) снижает число колоний до  $235,2 \pm 35,0$  ( $p < 0,05$ ). Однако степень этого снижения достоверно не отличается от действия самого лазерного облучения ( $p > 0,05$ ), т.е. отчетливого фотодинамического эффекта не наблюдается. Увеличение дозы фотовоздействия до 60 Дж/см<sup>2</sup> вызывает еще большее угнетение роста бактерий (до  $128,0 \pm 17,7$  колоний,  $p < 0,01$ ). В этом проявляется явное фотодинамическое действие, поскольку степень ингибиции роста бактерий достоверно превышает лазерный эффект ( $p < 0,01$ ). В дальнейшем по мере увеличения дозы облучения наблюдается прогрессирующее угнетение роста колоний: при облучении в дозах 90 и 180 Дж/см<sup>2</sup> количество колоний

уменьшается до  $102,8 \pm 15,5$  ( $p < 0,001$ ) и  $69,6 \pm 13,8$  ( $p < 0,001$ ) соответственно, что также заметно превышает степень торможения бактериального роста при воздействии только лазера ( $p < 0,01$  и  $p < 0,001$ ) и свидетельствует о фотодинамическом эффекте фотодитазина.

В опытах со штаммом MRSA предварительная обработка фотодитазином с последующим лазерным облучением в дозах 30 и 60 Дж/см<sup>2</sup> достоверно не влияли на число колоний. Так, при использовании дозы облучения 30 Дж/см<sup>2</sup> число колоний составило  $248,2 \pm 52,5$  ( $p > 0,2$ ), при 60 Дж/см<sup>2</sup> —  $151,8 \pm 34,0$  ( $p > 0,05$ ). При дальнейшем увеличении дозы облучения регистрировалось отчетливое угнетение клеточного роста: число колоний при дозе облучения 90 Дж/см<sup>2</sup> уменьшалось до  $66,4 \pm 16,2$  ( $p < 0,01$ ), при 180 Дж/см<sup>2</sup> — до  $34,4 \pm 12,8$  ( $p < 0,01$ ). Причем при действии двух последних доз лазерного облучения выявлялся отчетливый фотодинамический эффект: степень угнетения роста бактериальных колоний была значительно выше после предварительного действия фотодитазина, чем при действии только лазера ( $p < 0,05$  и  $p < 0,01$  соответственно).

Таким образом, лазерное излучение красного диапазона спектра оказывает непосредственное бактериостатическое действие на рост метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного штаммов *S. aureus*, причем этот эффект более выражен на резистентном штамме. Предварительная сенсibilизация бактериальных клеток фотодитазином заметно усиливает ростиингибирующий эффект.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Braga E.D., Aguiar-Alves F., de Freitas M.F. et al. High prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* colonization among healthy children attending public daycare centers in informal settlements in a large urban center in Brazil. *BMC Infect. Dis.* 2014, 6 (14): 538.
2. Carrel M., Schweizer M.L., Sarrazin M.V. et al. Residential proximity to large numbers of swine in feeding operations is associated with increased risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization at time of hospital admission in rural Iowa veterans. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 2014, 35 (2): 190-193.
3. Dissemond J., Goos M., Esser S. Pathogenetic significance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in chronic wounds. *Vasa.* 2003, 32 (3): 131-138.
4. McKinnell J.A., Miller L.G., Eells S.J. et al. A systematic literature review and meta-analysis of factors associated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization at time of hospital or intensive care unit admission. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 2013, 34 (10): 1077-1086.
5. Miller R.M., Price J.R., Batty E.M. et al. Healthcare-associated outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: role of a cryptic variant of an epidemic clone. *J. Hosp. Infect.* 2014, 86 (2): 83-89.

*Поступила 10.10.16*

Контактная информация: Егорова Анна Валериевна, к.м.н.,  
410012, Саратов, ул. Б.Казачья, 112, р.т. (8917)210-69-80