



УДК [57.063.8:616.98:579.861.2] – 048.88:615.373.35:615.849.19 (045)

ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ КРАСНОЙ ОБЛАСТИ СПЕКТРА НА РОСТ ШТАММОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФОТОДИТАЗИНА



А. В. Егорова, Г. Е. Брилли, И. О. Бугаева, Е. С. Тучина, О. В. Нечаева

Егорова Анна Валериевна, доцент кафедры гистологии, Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского, кандидат медицинских наук. E-mail: AV_Egorova@VK.RU

Брилли Григорий Ефимович, профессор кафедры патологической физиологии, Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского, доктор медицинских наук. E-mail: gbrill@yandex.ru

Бугаева Ирина Олеговна, профессор кафедры гистологии, Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского, доктор медицинских наук. E-mail: bugaeva@sgmu.ru

Тучина Елена Сергеевна, доцент кафедры биохимии и биофизики, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, кандидат биологических наук. E-mail: tuchinaes@gmail.com

Нечаева Ольга Викторовна, доцент кафедры экологии, Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю. А., кандидат биологических наук. E-mail: olgav.nechaeva@rambler.ru

Исследовано влияние лазерного излучения красной области спектра на рост колоний метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного штаммов золотистого стафилококка, а также изучен фотодинамический эффект фотосенсибилизатора фотодитазина. Установлено, что излучение полупроводникового красного лазера ($\lambda - 660$ нм, 100 мВт/см²) оказывает непосредственное бактериостатическое действие на рост *S. aureus*. Этот эффект на стандартном штамме проявляется только при использовании относительно высоких доз облучения (180 Дж/см²). Угнетение роста бактерий при этом достигает 36%. Метициллин-резистентный штамм *S. aureus* более чувствителен к бактериостатическому действию излучения красного лазера, поскольку угнетающее влияние на рост бактериальных колоний оказывают меньшие дозы света (60 и 90 Дж/см²). При максимальной дозе облучения, использованной в наших опытах, угнетение роста бактерий составляет 67%. Предварительная сенсibilизация бактериальных клеток фотодитазином заметно усиливает ростигибирующий эффект. Бактериостатическое действие излучения красного лазера на метициллин-чувствительный штамм *S. aureus* проявляется при действии дозы 90 Дж/см². Степень угнетения роста бактериальных колоний метициллин-резистентного штамма *S. aureus* также значительно выше после предварительного действия фотодитазина, чем при действии только лазера.

Ключевые слова: золотистый стафилококк, лазерное излучение, фотодитазин.

DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-4-428-431

Золотистый стафилококк является возбудителем многих заболеваний человека и до последнего времени остается наиболее частой причиной возникновения внутрибольничных инфекций [1, 2]. 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) [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 золотистый стафилококк 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 Саратовского государственного медицинского университета имени В. И. Разумовского. Для культивирования бактерий использовали ГРМ-агар (ГНЦ ПМБ «Оболонск», Россия). Для облучения культур микроорганизмов использовали полупроводниковый лазер (EMRED Oy, Финляндия), генерирующий излучение красной области спектра ($\lambda - 660$ нм) в непрерывном режиме. Плотность мощности – 100 мВт/см², время облучения – 5 , 10 , 15 и 30 мин. При этом суммарная энергетическая доза облучения составляла соответственно 30 , 60 , 90 и 180 Дж/см². Для сенсibilизации бактериальных клеток использовали водный раствор фотодитазина



(N-диметилглюкаминная соль хлорина Е6) в концентрации 5×10^{-6} М (производитель – ООО «ВЕТА-ГРАНД, Москва, Россия»). Фотосенсибилизатор был любезно 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, Москва); 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 ч 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 их обсуждение

Среднее количество колоний при росте метициллин-чувствительного штамма в контроле (без воздействия) составило $373,6 \pm 46,2$. Лазерное облучение в суммарной дозе 30, 60 и 90 Дж/см^2 не вызывало достоверного изменения числа колоний ($p > 0,1$). Однако фотовоздействие в дозе 180 Дж/см^2 уменьшало количество 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 отли-

чалось от роста стандартного штамма ($p > 0,5$). После облучения лазером в суммарной дозе 30 Дж/см^2 угнетения клеточного роста также не наблюдалось ($p > 0,05$). Увеличение дозы фотовоздействия приводило к подавлению бактериального роста. Так, при использовании дозы 60 Дж/см^2 число колоний уменьшилось до $143,2 \pm 19,6$ (на 55%, $p < 0,05$), при 90 Дж/см^2 – до $126,4 \pm 16,8$ (на 61%, $p < 0,05$), при 180 Дж/см^2 – 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 золотистого стафилококка, причем этот эффект на стандартном штамме проявляется только при использовании относительно высоких доз облучения (180 Дж/см^2). Фоточувствительность метициллин-резистентного штамма оказалась значительно выше: бактериостатическое действие красного света отмечалось уже при дозе 60 Дж/см^2 .

Последующие эксперименты позволили определить, 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 5×10^{-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^2) снижает число колоний до $235,2 \pm 35,0$ ($p < 0,05$) (табл. 1.). 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^2 вызывает еще большее угнетение роста бактерий (до $128,0 \pm 17,7$ колоний; $p < 0,01$). В этом проявляется явное фотодинамическое действие, поскольку степень подавления роста бактерий достоверно превышает лазерный эффект ($p_1 < 0,01$). В дальнейшем по мере увеличения энергетической экспозиции облучения наблюдается прогрессирующее угнетение роста колоний: при облучении в дозах 90 и 180 Дж/см^2 количество колоний уменьшает-



ся 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 ($p_1 < 0,01$ и $p_1 < 0,001$) и свидетельствует о фотодинамическом эффекте фотодитазина (см. табл. 1).

Таблица 1

Влияние лазерного излучения и предварительной обработки фотодитазинном (ФД) на рост метициллин-чувствительного штамма *Staphylococcus aureus* (число колоний)

Серия опытов	Доза (Дж/см ²)			
	30	60	90	180
Лазер (660 нм)	$343,2 \pm 45,8$ $p > 0,5$	$317,0 \pm 42,2$ $p > 0,2$	$275,8 \pm 31,5$ $p > 0,1$	$238,8 \pm 21,8$ $p < 0,02$
ФД+лазер	$235,2 \pm 35,0$ $p < 0,05$ $p_1 > 0,05$	$128,0 \pm 17,7$ $p < 0,01$ $p_1 < 0,01$	$102,8 \pm 15,5$ $p < 0,001$ $p_1 < 0,01$	$69,6 \pm 13,8$ $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$

Примечание. Число колоний в контроле – $373,6 \pm 46,2$; p – достоверность разницы с контролем; p_1 – достоверность разницы с соответствующей дозой при действии лазера.

В опытах со штаммом MRSA предварительная обработка фотодитазинном с последующим лазерным облучением в дозах 30 и 60 Дж/см² достоверно не влияла на число коло-

ний. Так, при использовании дозы облучения 30 Дж/см² число колоний составило $248,2 \pm 52,5$ ($p > 0,2$), при 60 Дж/см² – $151,8 \pm 34,0$ ($p > 0,05$) (табл. 2).

Таблица 2

Влияние лазерного облучения и предварительной обработки фотодитазинном (ФД) на рост метициллин-резистентного штамма *Staphylococcus aureus* (число колоний)

Серия опытов	Доза, Дж/см ²			
	30	60	90	180
Лазер (660 нм)	$176,4 \pm 25,3$ $p > 0,05$	$143,2 \pm 19,6$ $p < 0,05$	$126,4 \pm 16,8$ $p < 0,05$	$107,2 \pm 14,8$ $p < 0,02$
ФД+лазер	$248,2 \pm 52,5$ $p > 0,2$ $p_1 > 0,2$	$151,8 \pm 34,0$ $p > 0,05$ $p_1 > 0,5$	$66,4 \pm 16,2$ $p < 0,01$ $p_1 < 0,05$	$34,4 \pm 12,8$ $p < 0,01$ $p_1 < 0,01$

Примечание. Число колоний в контроле – $320,6 \pm 69,9$; p – достоверность разницы с контролем; p_1 – достоверность разницы с соответствующей дозой при действии лазера.

При дальнейшем увеличении дозы облучения регистрировалось отчетливое угнетение клеточного роста: число колоний при дозе облучения 90 Дж/см² уменьшалось до $66,4 \pm 16,2$ ($p < 0,01$), при 180 Дж/см² – 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 ($p_1 < 0,05$ и $p_1 < 0,01$ 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 бактериаль-

ных клеток фотодитазинном заметно усиливает ростингибирующий эффект.

Список литературы

1. McKinnell J. A., Miller L. G., Eells S. J., Cui E., Huang S. S. A systematic literature review and meta-analysis of factors associated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization a time of hospital or intensive care unit admission // Infect. Control Hosp. Epidemiol. 2013. Vol. 34, № 10. P. 1077–1086.
2. Carrel M., Schweizer M. L., Sarrazin M. V., Smith T. C., Perencevich E. N. 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. Vol. 35, № 2. P. 190–193.
3. Dissemmond J., Goos M., Esser S. Pathogenetic significance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in chronic wounds // Vasa. 2003. Vol. 32, № 3. P. 131–138.



4. Braga E. D., Aguiar-Alves F., de Freitas M. F. 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. Vol. 6, № 14. P. 538.
5. Miller R. M., Price J. R., Batty E. M. Healthcare-associated outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: role of a cryptic variant of an epidemic clone // J. Hosp. Infect. 2014. Vol. 86, № 2. P. 83–89.

Photodynamic Effect of Red Laser Radiation on the Growth of *Staphylococcus aureus* Strains with the Use of Photoditazine

A. V. Egorova, G. E. Brill, I. O. Bugaeva, E. S. Tuchina, O. V. Nechaeva

Anna V. Egorova, ORCID 0000-0001-7112-2556, Saratov State Medical University, 112, Bolshaya Kazachya Str., Saratov, 410012, Russia, AV_Egorova@BK.RU

Grigory E. Brill, ORCID 0000-0002-0402-9420, Saratov State Medical University, 112, Bolshaya Kazachya Str., Saratov, 410012, Russia, gbrill@yandex.ru

Irina O. Bugaeva, ORCID 0000-0002-1447-4325, Saratov State Medical University, 112, Bolshaya Kazachya Str., Saratov, 410012, Russia, bugaeva@sgmu.ru

Elena S. Tuchina, ORCID 0000-0003-4498-2846, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, tuchinaes@gmail.com

Olga V. Nechaeva, ORCID 0000-0003-3331-1051, Yuri Gagarin State Technical University, 77, Polytechnicheskaya Str., Saratov, 410054, Russia, olgav.nechaeva@rambler.ru

The influence of red laser irradiation on the growth of colonies of *Staphylococcus aureus* and photodynamic effect of the photosensitizer Photoditazin were performed. It is established that the radiation of a semiconductor red laser ($\lambda = 660 \text{ nm}$, 100 mW/cm^2) has a direct bacteriostatic effect on the growth of *S. aureus*. This effect on the standard strain is manifested only when relatively high doses are used (180 J/cm^2). Inhibition of bacterial growth reaches 36%. Photosensitivity of the methicillin-resistant strains was much higher: bacteriostatic effect of red light was observed already at the dose of 60 J/cm^2 . At the maximum dose of irradiation used in our experiments, the inhibition of bacterial growth is 67%. Pre-treatment of bacterial cells by Photoditazin significantly enhances the inhibitory effect of the laser light. The bacteriostatic action of the red laser radiation on the methicillin-sensitive *S. aureus* strain is manifested when the doses of 90 J/cm^2 is applied. The degree of inhibition of growth of bacterial colonies of the methicillin-resistant *S. aureus* strain is also significantly higher after the preliminary action of Photoditazin than with the action of only the laser.

Key words: *Staphylococcus aureus*, red laser radiation, photoditazin.

Образец для цитирования:

Егорова А. В., Бриль Г. Е., Бугаева И. О., Тучина Е. С., Нечаева О. В. Фотодинамическое воздействие лазерного излучения красной области спектра на рост штаммов *Staphylococcus aureus* с использованием фотодитазина // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2017. Т. 17, вып. 4. С. 428–431. DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-4-428-431.

Cite this article as:

Egorova A. V., Brill G. E., Bugaeva I. O., Tuchina E. S., Nechaeva O. V. Photodynamic Effect of Red Laser Radiation on the Growth of *Staphylococcus aureus* Strains with the Use of Photoditazine. *Izv. Saratov Univ. (N.S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2017, vol. 17, iss. 4, pp. 428–431 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-4-428-431.