

8. Kurtz S.M., Gawel H.A., Patel J.D. History and systematic review of wear and osteolysis outcomes for first-generation highly cross-linked polyethylene // Clin Orthop Relat Res. – 2011. – 469. – P. 2262–2277.
9. Mutimer J., Devane P.A., Adams K., Horne J.G. Highly cross-linked polyethylene reduces wear in total hip arthroplasty at 5

years // Clin. Orthop. Relat. Res. – 2010. – № 468. – P. 3228–3233.

Поступила в редакцию 03.12.2015 г.

Контактное лицо: Якунов Расуль Радиикович
E-mail: rasul@mail.ru

УДК 57.063.8:616.98:579.861.2-048.66:615.849.19(045)

Брилль Г.Е.¹, Егорова А.В.¹, Тучина Е.С.², Бугаева И.О.¹, Морозов О.А.²

Подавление роста штаммов золотистого стафилококка светом низкоинтенсивного красного лазера

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

Suppression of staphylococcus aureus growth by low-intensity red laser light

¹ ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России, г. Саратов

² ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского», г. Саратов

Целью настоящей работы явилось изучение принципиальной возможности подавления роста различных штаммов золотистого стафилококка светом низкоинтенсивного красного лазера с длиной волны 660 нм. В качестве объекта исследования использовались клетки метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного штаммов золотистого стафилококка. Для облучения применялся полупроводниковый лазер, генерирующий линейно-поляризованное излучение красной области спектра (λ – 660 нм). Плотность мощности составляла 100 мВт/см², время облучения – 5, 10, 15 и 30 мин, энергетическая экспозиция – соответственно 30, 60, 90 и 180 Дж/см². Установлено, что низкоинтенсивное лазерное излучение оказывает ингибирующее влияние на рост колоний как метициллин-чувствительного, так и метициллин-резистентного штаммов золотистого стафилококка, причем резистентный штамм обладает более высокой чувствительностью к действию красного света, поскольку бактериостатический эффект выявляется при действии более низких доз облучения. Ключевые слова: золотистый стафилококк, низкоинтенсивный лазер, бактериостатический эффект.

Purpose. To study evident abilities of low-intensity red laser light with wavelength 660 nm to inhibit the growth of various strains of Staphylococcus aureus. Materials and methods. Methicillin-sensitive and methicillin-resistant strains of Staphylococcus aureus were used as studied objects. Semiconductor laser generating linear polarized light in the red spectral region (λ – 660 nm) was used for irradiation. Power density was 100 mW/cm², exposure time – 5, 10, 15 and 30 min, heat density was 30, 60, 90 and 180 J/cm², respectively. Results. It has been found out that low-intensity laser radiation has an inhibitory effect at the growth of both methicillin-sensitive and methicillin-resistant strains of Staphylococcus aureus. The resistant strain is more sensitive to red laser light as the bacteriostatic effect is seen at lower doses. Keywords: Staphylococcus aureus, low-intensity laser, bacteriostatic effect.

Золотистый стафилококк является возбудителем многих заболеваний человека. В организме практически нет органа или ткани, которые были бы устойчивы к действию токсинов патогенного стафилококка. До последнего времени стафилококк остается наиболее частой причиной возникновения внутрибольничных инфекций [3, 10]. 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 полирезистентных штаммов [2, 11]. Последнее диктует необходимость изыскания новых немедикаментозных методов лечения стафилококковых поражений. В этом плане внимание исследователей давно привлекают различные виды низкоинтенсивного лазерного излучения. В большинстве работ используется фотодинамическая терапия (ФДТ),

предполагающая предварительную обработку бактериальных клеток каким-либо фотосенсибилизатором, повышающим их чувствительность к фотовоздействию, и последующее лазерное облучение [5, 8, 15]. Однако наблюдаемые при ФДТ бактериостатический или бактерицидный эффекты связаны не с прямым действием лазерного света, а обусловлены освобождением синглетного кислорода при фотовозбуждении молекулы фотосенсибилизатора. Возможность прямого бактериостатического действия низкоинтенсивного красного света на стафилококки показана в нескольких работах [4, 13]. Однако авторами использовались лазеры с различной длиной волны в пределах красной области спектра, применялись разные временные и дозовые параметры лазерного воздействия, объектом исследования служили разные штаммы *S. aureus*.

Целью настоящей работы явилось изучение принципиальной возможности подавления роста различных

штаммов золотистого стафилококка светом низкоинтенсивного красного лазера с длиной волны 660 нм.

Материал и методы исследования

В качестве объекта исследования использовались клетки золотистого стафилококка двух клинических штаммов, подразделенных в соответствии с их ответом на действие бета-лактамовых антибиотиков на метициллин-чувствительный (MSSA) и метициллин-резистентный (MRSA) штаммы. Бактериальные штаммы получены из музея кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии СГМУ им. В.И. Разумовского. Для культивирования бактерий использовался ГРМ-агар (ГНЦ ПМБ «Оболensk», Россия). Для облучения культур микроорганизмов применялся полупроводниковый лазер (EMRED Oy, Финляндия), генерирующий линейно-поляризованное излучение красной области спектра ($\lambda = 660$ нм) в непрерывном режиме. Плотность мощности составляла 100 мВт/см², время облучения – 5, 10, 15 и 30 мин, энергетическая экспозиция – соответственно 30, 60, 90 и 180 Дж/см². Для создания асептических условий полистирольный 96-луночный планшет для иммунологических исследований помещался в стерильный пластиковый корпус. Источник излучения располагался над ячейками планшета.

Бактериальная взвесь готовилась в стерильном физиологическом растворе по международному оптическому стандарту мутности 5 ед. (ГИСК им. Л.А. Тарасевича, Москва); конечная концентрация составляла 10^3 м.к./мл. Из конечного разведения бактериальную взвесь в объеме 0,2 мл вносили в ячейку планшета. Лазерному воздействию подвергалась взвесь бактериальных клеток, находящаяся в соответствующих ячейках. Последовательно увеличивалась доза облучения за счет возрастания продолжительности фотовоздействия. Затем из каждой ячейки делался высеv по 0,2 мл взвеси на чашки Петри с плотной питательной средой и равномерно распределялся по поверхности стерильным шпателем. Контролем служили взвеси бактерий, не подвергнутые облучению. Посевы контрольных и облученных микроорганизмов инкубировались в течение 48 часов при 37 °С. Оценка влияния излучения на микроорганизмы производилась путем подсчета числа выросших колоний. Все эксперименты повторяли пятикратно. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерной программы *GraphPad Prism-5* с использованием *U*-теста Манна–Уитни. Результаты представлены в виде $m \pm t$. Достоверными считали различия средних при $p < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

Результаты проведенных исследований представлены в таблице.

Как следует из таблицы, при 48-часовом выращивании стафилококкового штамма MSSA в контроле (без облучения) среднее число колоний, образуемых микробом на питательной среде, составило $373,6 \pm 46,2$. После предварительного облучения микробных клеток светом красного лазера в дозах 30, 60 и 90 Дж/см² заметного изменения числа колоний не наблюдалось ($0,5 < p > 0,1$).

Однако при увеличении суммарной дозы облучения до 180 Дж/см² имело место достоверное снижение числа образующихся колоний в 1,5 раза, т. е. отмечался отчетливый бактериостатический эффект ($p < 0,02$).

Т а б л и ц а
Влияние лазерного излучения ($\lambda = 660$ нм) на рост метициллин-чувствительного (MSSA) и метициллин-резистентного (MRSA) штаммов *Staphylococcus aureus* (число колоний)

Серия опытов	Без облучения	Доза облучения, Дж/см ²			
		30	60	90	180
Контроль (MSSA)	$373,6 \pm 46,2$				
Лазер + MSSA		$343,2 \pm 45,8$ $p > 0,5$	$317,0 \pm 42,2$ $p > 0,2$	$275,8 \pm 31,5$ $p > 0,1$	$238,8 \pm 21,8$ $p < 0,02$
Контроль (MRSA)	$320,6 \pm 69,9$				
Лазер + MRSA		$176,4 \pm 25,3$ $p > 0,05$	$143,2 \pm 19,6$ $p < 0,05$	$126,4 \pm 16,8$ $p < 0,05$	$107,2 \pm 14,8$ $p < 0,02$

Примечание. p – достоверность разницы с соответствующим контролем.

Среднее число колоний бактериальных клеток в опытах с метициллин-резистентным штаммом золотистого стафилококка (MRSA) в контроле составляло $320,6 \pm 69,9$ ($p > 0,5$ с соответствующим контролем метициллин-чувствительного штамма). Лазерное облучение взвеси бактериальных клеток уже в минимальной использованной дозе (30 Дж/см²) вызывало отчетливую тенденцию к торможению роста стафилококков, снижая количество образующихся колоний в 1,8 раза ($p > 0,05$). Дальнейшее увеличение дозы облучения заметно усиливало ингибиторный эффект, причем степень бактериостатического действия отчетливо зависела от используемой дозы фотовоздействия. Так, доза облучения 60 Дж/см² вызывала уменьшение числа колоний в 2,2 раза ($p < 0,05$), доза лазерного воздействия 90 Дж/см² – в 2,5 раза ($p < 0,05$), доза 180 Дж/см² уменьшала рост колоний в 3,0 раза ($p < 0,02$). При этом максимальная ингибция роста стафилококков составила 67%.

Следовательно, низкоинтенсивное линейно-поляризованное лазерное излучение красной области спектра ($\lambda = 660$ нм) при плотности мощности 100 мВт/см² оказывает ингибирующее влияние на рост колоний как метициллин-чувствительного, так и метициллин-резистентного штаммов золотистого стафилококка, причем метициллин-резистентный штамм обладает более высокой чувствительностью к действию красного света, чем метициллин-чувствительный, поскольку бактериостатический эффект красного света выявляется в последнем случае при действии более низких доз облучения.

Различная чувствительность разных штаммов золотистого стафилококка к свету красного лазера была отмечена и в работах других авторов. Показано, что различия в фоточувствительности бактериальных клеток имеют генетическую основу [6, 14]. И среди метициллин-резистентных и среди метициллин-чувствительных штаммов стафилококка встречаются как чувствительные, так и резистентные к фотодинамичес-

кой инактивации формы [12]. Тем не менее отмечено, что MRSA-штаммы значительно более устойчивы к фотоинактивации, чем MSSA [6].

Известно, что фоточувствительность стафилококков зависит от состояния внутриклеточной ДНК-репарирующей системы, включающей RecA-белок [7]. Когда RecA-экспрессия была угнетена антибиотиком новобиоцином или выключалась делецией соответствующего гена, чувствительность стафилококков к фотоинактивации увеличивалась в сотни раз. Отсутствие RecA увеличивает повреждение ДНК, приводящее к гибели микробной клетки. Важную роль в определении чувствительности бактериальной клетки к фотоинактивации играет активность внутриклеточного фермента супероксиддисмутазы (СОД) [12].

По-видимому, первичными акцепторами красного света в бактериальных клетках в отсутствие экзогенного фотосенсибилизатора являются молекулы внутриклеточных порфиринов, выступающих в качестве эндогенных фотосенсибилизаторов [9]. Молекула фотосенсибилизатора, взаимодействуя со световыми квантами, переходит в возбужденное синглетное состояние. В дальнейшем существуют два пути преобразования энергии: либо энергия переносится на окружающие субстраты (1-й тип реакции), либо на молекулярный кислород (2-й тип реакции). При первом и втором типе реакций образуются соответственно активные формы кислорода и синглетный кислород, которые могут вызывать повреждение бактериальной клетки, вызывая деструкцию ее мембран, либо приводя к повреждению ДНК [1].

Литература

1. *Alves E., Faustino M.A., Neves M.G. et al.* An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation // *Future Med. Chem.* – 2014. – 6. – P. 141–164.
2. *Braga E.D., Aguiar-Alves F., de Freitas Mde 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). – P. 538.
3. *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). – P. 190–193.
4. *Dadras S., Mohajerani E., Eftekhari F. u Hosseini M.* Different photoresponses of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas ae-*

ruginosa to 514, 532, and 633 nm low level lasers in vitro // *Curr. Microbiol.* – 2006. – 53 (4). – P. 282–286.

5. *de Oliveira S.C. P. S., Monteiro J.S.C., Pires-Santos G.M. et al.* In vitro influence of photodynamic antimicrobial chemotherapy on *Staphylococcus aureus* by using phenothiazines derivatives associated with laser/LED light // *Mechanisms for Low-Light Therapy IX*. Ed. by M.R. Hamblin, J.D. // Carroll, Praveen Arany, Proc. of SPIE 2014. – Vol. 8932. – 89320H.
6. *Grinholc M., Rapacka-Zdonczyk A., Rybak B. et al.* Multiresistant strains are as susceptible to photodynamic inactivation as their naïve counterparts: protoporphyrin IX-mediated photoinactivation reveals differences between methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* strains // *Photomedicine and Laser Surgery.* – 2014. – 32. – 3. – P. 121–129.
7. *Grinholc M., Rodziewicz A., Forys K. et al.* Fine-tuning *recA* expression in *Staphylococcus aureus* for antimicrobial photoinactivation: importance of photo-induced DNA damage in the photoinactivation mechanism // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2015. – Vol. 99. – P. 9161–9176.
8. *Hajim K.I., Salih D.S., Rassam Y.Z.* Laser light combined with a photosensitizer may eliminate methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* // *Lasers Med Sci.* – 2010. – Sep. 25 (5). – 743–748.
9. *Maclean M., Macgregor S.J., Anderson J.G., Woolsey G.A.* The role of oxygen in the visible-light inactivation of *Staphylococcus aureus* // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 2008. – Vol. 92. – № 3. – P. 180–184.
10. *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). – P. 1077–1086.
11. *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). – P. 83–89.
12. *Nakoneczna J., Michta E., Rybicka M. et al.* Superoxide dismutase is upregulated in *Staphylococcus aureus* following protoporphyrin-mediated photodynamic inactivation and does not directly influence the response to photodynamic treatment // *BMC Microbiology.* – 2010. – Vol. 10. – P. 323.
13. *Nussbaum E.L., Lilje L. u Mazzulli T.* Effects of 630-, 660-, 810-, and 905-nm laser irradiation delivering radiant exposure of 1–50 J/cm² on three species of bacteria *in vitro* // *J. Clin. Laser Med. Surg.* – 2002. – 20 (6). – P. 325–333.
14. *Rapacka-Zdonczyk A., Larsen A.R., Empel J. et al.* Association between susceptibility to photodynamic oxidation and the genetic background of *Staphylococcus aureus* // *Eur. J. Clin. Microbiol. – Infect. Dis.* – 2014. – 33. – P. 577–586.
15. *Wilson M., Yianni C.* Killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by low-power laser light // *J. Med. Microbiol.* – 1999. – 42. – P. 62–66.

Поступила в редакцию 23.03.2016 г.

Контактное лицо: Бриль Григорий Ефимович
E-mail: gbrill@yandex.ru