

УДК 615.849.19:579.861.2].015.8:615.33

ВПЛИВ ЛАЗЕРНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА ЧУТЛИВІСТЬ КУЛЬТУРИ ЗОЛОТИСТОГО СТАФІЛОКОКУ ДО АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ

В. В. Пантьо, В. І. Ніколайчук, М. В. Кривцова, В. І. Пантьо

Вплив лазерного випромінювання на чутливість культури золотистого стафілококу до антибактеріальних препаратів. — В. В. Пантьо, В. І. Ніколайчук, М. В. Кривцова, В. І. Пантьо. — Стаття присвячена вивченню впливу лазерного випромінювання різних довжин хвиль на культуру золотистого стафілококу та його чутливість до впливу антибактеріальних препаратів. Досліджено вплив лазерного випромінювання червоного та інфрачервоного діапазону на культуру мікроорганізму та вплив його на антибактеріальні препарати при різній потужності та експозиції. Виявлено значні зміни чутливості опромінених мікроорганізмів до неопромінених антибіотиків та зниження антибактеріального впливу опромінених антибіотиків до неопромінених мікроорганізмів. Виявлено зміни кривої росту опромінених культур золотистого стафілококу. Отримані результати можуть практично використовуватися у медицині при лікуванні стафілококової інфекції, дають поштовх до продовження досліджень впливу фізичних факторів на мікроорганізми.

Ключові слова: стафілокок, антибіотик, чутливість, лазер.

Адреса: Ужгородський національний університет, вул. Волошина, 32, 88000, Ужгород, Україна; e-mail: bio@univ.uzhgorod.ua.

Effect of laser emission on the Staphylococcus aureus culture antibiotic susceptibility. — V. V. Pantyo, V. I. Nikolajchuk, M. V. Kryvtsova, V. I. Pantyo. — The article is devoted to study of the effect of laser emission of different wave-length on the Staphylococcus aureus culture and its antibiotic susceptibility. The effect of laser emission of red and infra-red range with different capacity and exposition on the Staphylococcus aureus culture and its antibiotic susceptibility was researched. The significant changes of sensibility of irradiated bacteriums to unirradiated antibiotics and the reduction of antibacterial action of irradiated antibiotics on unirradiated bacteriums were discovered. The change of growth curve of irradiated Staphylococcus aureus culture was detected. Research findings can be used in treatment of the staphylococcosis and stimulate study of effect of physical agents on microorganisms off.

Keywords: Staphylococcus, antibiotic, antibiotic susceptibility, laser.

Address: Uzhhorod national university, 32, Woloszyn str., 88000, Uzhgorod, Ukraine; e-mail: bio@univ.uzhgorod.ua.

Вступ

Успіх антибіотикотерапії залежить від правильного вибору антибіотика, що можливо тільки при встановленні раннього бактеріологічного діагнозу, доповненого результатами визначення чутливості виділеного збудника до хіміотерапевтичного препарату.

Точні та швидкі лабораторні методи дослідження набувають особливого значення протягом останніх років через широке розповсюдження антибіотикостійких штамів мікроорганізмів та зниження ефективності антибіотикотерапії [1, 3]. Процес збільшення стійких клінічних штамів мікроорганізмів до антибіотиків, які широко використовуються у клініці, погіршив результати лікування стафілококових інфекцій. Має місце також стійкість до антибіотиків і грамнегативних мікроорганізмів, у тому числі представників роду *Pseudomonas* та родини *Enterobacteriaceae*. Стійкі мікроорганізми зустрічаються і серед збудників особливо небезпечних інфекцій (*V. Cholerae* та ін.) [2, 4, 5]. Проблема ускладнює розповсюдження

стійкості до фармакологічних чинників та можливість переносу її позахромосомними елементами (R-факторами) не тільки в межах одного виду, а й на інші види бактерій [1, 3, 4, 7].

Дія лазерного (монохроматичного) випромінювання на організм людини та тварини значно перевищує дію звичайного білого (сонячного) світла. Враховуючи, що живі організми та біосфера загалом є не ізольованими, а відкритими системами, які обмінюються енергією та речовиною, можна стверджувати, що за оптимального дозування лазерного випромінювання відбувається відповідне енергетичне підкачування організму [6]. Кінцевим результатом лазерної біостимуляції є підвищення резистентності організму з розширенням меж його адаптації, а отже і підвищенням його стійкості до різного роду захворювань [6].

З усіх видів лікування в медицині найбільших успіхів на сьогодні досягла хіміотерапія. Однак, її майже міфічні можливості обернулися її ж обмеженістю, і зараз уже загальновідомо, що практич-

но кожен препарат має побічну дію на організм [2, 5, 8]. Через це медики почали акцентувати увагу на альтернативних методах лікування, в тому числі на лазеротерапії. Слід також згадати можливість її поєднання з традиційними способами лікування, малоінвазивність більшості процедур, неболючість та комфортність для пацієнтів. Проведення лазерної терапії на медикаментозному фоні підвищує ефективність комплексної терапії, особливо при складніших варіантах захворювань.

Але як впливає монохроматичне випромінювання на мікроорганізми? Чи змінюються властивості останніх? Чи є безпосередня дія на мікроорганізми бактерицидною? Який ефект нам слід очікувати при сумісному використанні медикаментозної терапії та фізичних факторів?

Матеріали та методи досліджень

Досліджено чутливість до антибіотиків патогенних штамів *Staphylococcus aureus*, ізольованих як із гнійних ран, так й із крові хворих з гнійною хірургічною інфекцією, методом дифузії в агарі. Чутливість мікроорганізмів до антибіотиків визначали шляхом вимірювання зон затримки росту. Після опромінення чутливість культур *Staphylococcus aureus* до тих самих антибіотиків визначали шляхом пересіву на поживне середовище для визначення уразливості мікроорганізмів до антибіотиків (середовище АГВ/AGV) із наступним нанесенням мембранних дисків.

Паралельно проводили опромінення культур, висіяних у цукровий бульйон, нерухомим променем гелій-неонового (довжина хвилі 632,8 нм, потужність 15 мВт) та інфрачервоного напівпровідникового (довжина хвилі 870 нм, потужність 15 мВт) лазерів з відстані 1 см до стандартного завису культур (5 млн. мікробних тіл на 1 мл), які знаходилися у пробірці. Джерелами червоного та інфрачервоного лазерного випромінювання були вітчизняні лазери АФЛ-2 (довжина хвилі 632,8 нм) та ЛІКА-03 (довжина хвилі 870 нм). Використовували експозиції 3, 6 та 10 хв. Важливо відзначити, що всі штами мікроорганізмів знаходилися під час опромінення на початку логарифмічної (експоненціальної) фази росту.

Окремою групою проводилося аналогічне опромінення дисків, насичених антибіотиками, із наступним нанесенням їх на неопромінені культури.

Результати досліджень та їх обговорення

У результаті проведених досліджень виявлено значні зміни чутливості до антибіотиків мікрофлори, яка була об'єктом дослідження. При оцінюванні результатів дослідів, який проводили методом дифузії в агарі, визначали діаметр зон затримки росту мікробів навколо дисків, включаючи діаметр самого диску (рис. 1).

Після опромінення низькоенергетичними лазерами дані зони збільшувалися (рис. 2 – 5), а їхні розміри залежали від експозиції опромінення. Найбільш це було виражено за трихвилинного опромінення (рис. 2 – 4).

Кількість мікробіологічних досліджень для визначення чутливості мікрофлори до антибіотиків до і після опромінення культур низькоенергетичним лазерним випромінюванням наведено в таблиці 1.

При використанні гелій-неонового (червоного) та інфрачервоного напівпровідникового лазера отримані аналогічні результати, які мало відрізнялись один від одного (табл. 2). Різниця діаметрів зон затримки росту опромінених культур та контрольної культури статистично достовірна ($P < 0,05$).

Як видно з табл. 2, після опромінення культури *St. aureus* червоним лазером протягом 3 хвилин чутливість його до гентаміцину збільшилась в 1,3 рази, що збільшило зону затримки росту на 29,3% в порівнянні з контролем.

Опромінення *St. aureus* гелій-неоновим лазером в експозиції 6 та 10 хвилин теж збільшує чутливість його до гентаміцину і збільшує зони затримки росту відповідно на 19,7% та 6,4%, однак це значно менше, ніж при 3-хвилинній експозиції.

Дані табл. 2 показують, що 3-хвилинне опромінення *St. aureus* червоним лазером підвищує чутливість до всіх досліджуваних антибіотиків. Наприклад, зона затримки росту до ампіциліну збільшилась на 59,6%, що в 1,6 рази більше в порівнянні з контролем.

Оцінюючи досліді з опроміненими дисками, які наносилися на неопромінені культури, можна відзначити зменшення діаметру зон затримки росту мікроорганізмів, що було розцінено нами як свідчення деякої інактивації антибіотиків від прямої НЕЛВ (табл. 3).

Таблиця 1. Кількість мікробіологічних досліджень для визначення чутливості мікрофлори до антибіотиків до і після опромінення культур

Висіяна культура	Кількість досліджень		
	До опромінення	Після опромінення червоним лазером	Після опромінення інфрачерв. лазером
<i>Staphylococcus aureus</i>	27	27	27

Таблиця 2. Діаметр (мм, $M \pm m$) зон затримки росту при лазерному опроміненні культури *Staphylococcus aureus*

Антибіотик	Контроль (n=22)	Експозиція 3 хв. (n=27)		Експозиція 6 хв. (n=27)		Експозиція 10 хв. (n=27)	
		червоний лазер	інфрачерв. лазер	червоний лазер	інфрачерв. лазер	червоний лазер	інфрачерв. лазер
Цефатаксім	23,7±0,2	29,2±0,5 ($P_1 < 0,05$)	30,1±0,4 ($P_1 < 0,001$)	27,2±0,4 ($P_2 < 0,05$)	26,7±0,5 ($P_2 < 0,05$)	25,3±0,3 ($P_3 < 0,05$)	24,1±0,2 ($P_3 > 0,05$)
Ампіцилін	19,1±0,3	30,8±0,6 ($P_1 < 0,001$)	25,9±0,3 ($P_1 < 0,05$)	27,6±0,3 ($P_2 < 0,05$)	24,3±0,3 ($P_2 > 0,05$)	25,7±0,4 ($P_3 < 0,05$)	22,3±0,2 ($P_3 > 0,05$)
Гентаміцин	21,8±0,4	28,2±0,3 ($P_1 < 0,001$)	26,1±0,5 ($P_1 < 0,05$)	26,1±0,4 ($P_2 < 0,05$)	25,4±0,2 ($P_2 < 0,05$)	23,2±0,2 ($P_3 > 0,05$)	22,4±0,3 ($P_3 > 0,05$)
Оксацилін	22,2±0,2	26,8±0,4 ($P_1 < 0,05$)	25,8±0,4 ($P_1 < 0,05$)	23,4±0,2 ($P_2 > 0,05$)	25,1±0,3 ($P_2 < 0,05$)	22,4±0,3 ($P_3 > 0,05$)	23,1±0,2 ($P_3 > 0,05$)

P_1 — достовірність різниці між 3-хвилинною експозицією та контролем.

P_2 — достовірність різниці між 6-хвилинною експозицією та контролем.

P_3 — достовірність різниці між 10-хвилинною експозицією та контролем

Таблиця 3. Діаметр (мм) зон затримки росту неопроміненої культури *Staphylococcus aureus* при опроміненні дисків з антибіотиками

Антибіотики	Контроль (n = 16)	Опромінення (n = 16)
Цефатаксім	23,7±0,2	21,8±0,2 $P < 0,05$
Ампіцилін	19,1±0,3	16,1±0,3 $P < 0,05$
Гентаміцин	21,8±0,4	17,9±0,3 $P < 0,05$
Оксацилін	22,2±0,2	16,8±0,2 $P < 0,05$

P — достовірність різниці між опроміненням дисків та контролем.



Рис. 1. Визначення чутливості мікрофлори (*Staphylococcus aureus*) до антибіотиків методом дифузії в агар (контроль).



Рис. 2. Визначення чутливості мікрофлори (*Staphylococcus aureus*) до антибіотиків методом дифузії в агар (опромінення гелій-неоновим лазером, експозиція 3 хв.)

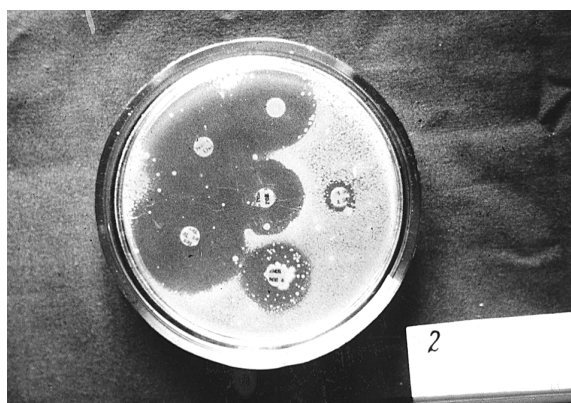


Рис. 3. Визначення чутливості мікрофлори (*Staphylococcus aureus*) до антибіотиків методом дифузії в агар (опромінення гелій-неоновим лазером, експозиція 6 хв.)

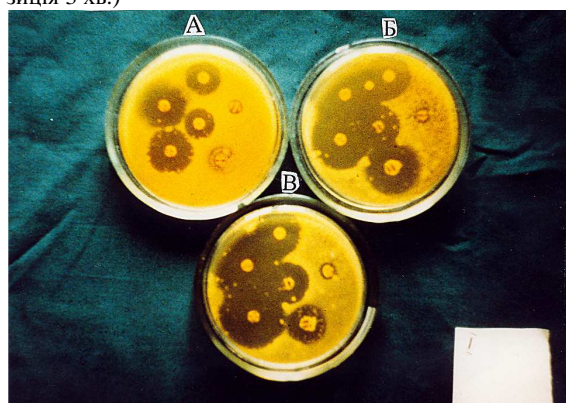


Рис. 4. Визначення чутливості мікрофлори (*Staphylococcus aureus*) до антибіотиків методом дифузії в агар (експозиція 3 хв.): А — контроль, Б — опромінення гелій-неоновим лазером, В — опромінення інфрачервоним лазером.

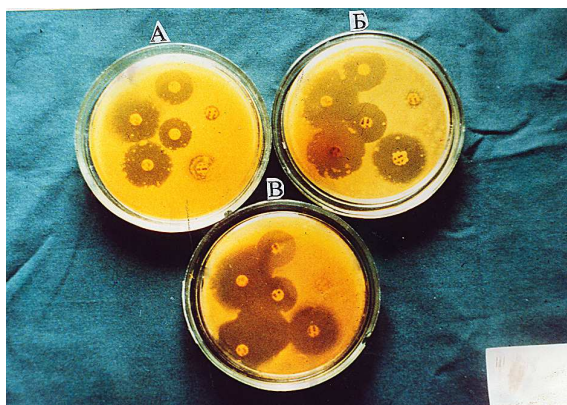


Рис. 5. Визначення чутливості мікрофлори (*Staphylococcus aureus*) до антибіотиків методом дифузії в агар (експозиція 6 хв.): А — контроль, Б — опромінення гелій-неоновим лазером, В — опромінення інфрачервоним лазером.

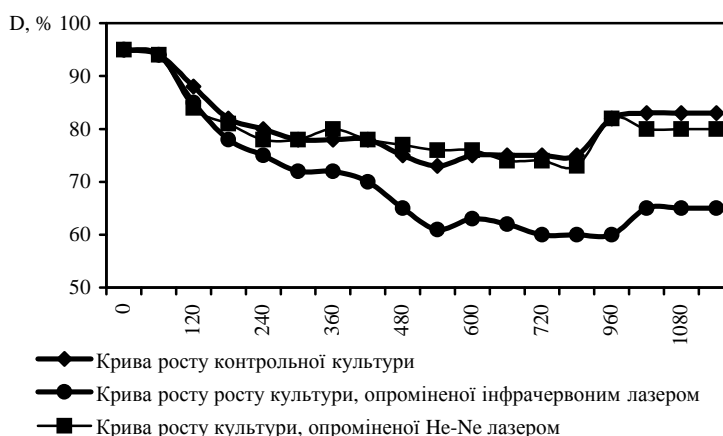


Рис. 6. Зміна оптичної густини завису культури *Staphylococcus aureus* при дії лазерного опромінення

Отримані нами дані зумовили проведення серії дослідів із культурою золотистого стафілококу з метою визначення кількісної оцінки виявлених фотомодифікуючих властивостей низькоенергетичного лазерного випромінювання (НЕЛВ) методом серійних розведень у бульйоні. При цьому готували серію розведень антибіотика (використовували оксацилін) у рідкому поживному середовищі і вносили у кожне розведення антибіотика однакову кількість досліджуваної культури. Після періоду інкубації відзначали наявність або відсутність росту мікроорганізмів. Метод дозволив нам визначити мінімальну концентрацію антибіотика, яка пригнічує зростання мікроорганізмів (МІК — мінімальна інгібуюча концентрація).

При оцінюванні отриманих результатів методом серійних розведень антибіотиків у бульйоні ми виявили, що МІК оксациліну знизилася з 0,5 мкг/мл у контрольній культурі золотистого стафілококу до 0,25 мкг/мл в опроміненій культурі, що у два рази нижче, ніж у контролі — без опромінення.

Виявлені на першому та другому етапах роботи зміни зумовили проведення серії дослідів з вивчення змін кривої росту золотистого стафілококу при дії на нього НЕЛВ різної довжини хвилі. Для

побудови графіка росту використовували зміну оптичної густини 18-годинної стандартної культури золотистого стафілококу у м'ясо-пептонному бульйоні без опромінення та після опромінення гелій-неоновим (довжина хвилі 632,8 нм, потужність 15 мВт) та інфрачервоним (довжина хвилі 870 нм, потужність 15 мВт) лазерами. Опромінення проводили у пробірці нерухомим променем з відстані 1 см при експозиції 3 хвилини. Визначення оптичної густини проводили за допомогою колориметра фотоелектричного концентраційного КФК-2 у стандартних кюветах.

Проведений аналіз кривих зміни оптичної густини завису культури *St. aureus* при дії лазерного випромінювання представлений на рис. 3.6. Як видно, форма кривої росту контрольної неопроміненої культури тотожна описанам у літературі (крива 1 на рис. 6). Криві росту культур, опромінених гелій-неоновим та інфрачервоним лазерами, при збереженні закономірностей росту періодичних культур, мають інші кількісні властивості і характеризуються більш швидкою зміною оптичної густини завису культури (криві 2, 3 на рис. 6). Ці зміни більш виражені для інфрачервоного НЕЛВ.

Висновок

Таким чином, низькоенергетичне лазерне випромінювання як червоного, так й інфрачервоного діапазонів має виражену фотомодифікуючу дію, сприяє більш ефективній дії антибіотиків на мікроорганізми і тому може бути застосоване у комплексній терапії бактеріальних інфекцій. Опромінювання червоним та інфрачервоним лазерами культур *St. aureus* збільшує зону затримки росту при дії антибіотиків на 13,2 - 59,6 %. Найбільш виражений ефект спостерігається при 3 - хвилинному

опроміненні та потужності 15 мВт, що відповідає дозі 2,7 Дж. При цьому зони затримки росту культури мікроорганізму при дії на нього антибіотиків збільшується в 1,3 - 1,8 рази у порівнянні із зонами затримки росту контрольної культури.

Отримані відмінності кривих росту мікроорганізмів при дії НЕЛВ підтверджують якісні зміни в опромінених культурах та дають поштовх до вивчення глибинних механізмів впливу лазерного випромінювання з різними довжинами хвилі на клітину, тканину та організм у цілому.

1. Бостанджян М. Г., Оракаева Н. С., Зюзько Ф. К. К вопросу о плазмидной антибиотикоустойчивости культур *St. aureus*, выделенных у больных с гнойной хирургической инфекцией и из объектов внешней среды // *Здравоохранение Туркменистана*. – 1989 – № 4 – С. 23–26
2. Воробьев А. А., Быков А. С., Пашков Е. П., Рыбакова А. Н. *Микробиология*. – М.: Медицина, 1994. – 288 С.
3. Дорофеев Д. А. Чувствительность штаммов золотистого стафилококка к антибиотикам у детей с различным количеством лимфоцитов // *Український медичний альманах*. – 2005 – № 4 – С. 58–59
4. Климнюк С. І., Ситник І. О., Творко М. С., Ширококов В. П. *Практична мікробіологія*. – Тернопіль: Українська медична книга, 2004. – 440 С.
5. Коротаев А. И., Бабичев С. А. *Медицинская микробиология, иммунология и вирусология*. – СПб.: Спец лит, 2002. – 591 С.
6. Попов В. Д. *Современные аспекты квантовой терапии в клинической медицине*. – К. – 1996, – 133 С.
7. Пяткін К. Д., Кривошеїн Ю. С. *Мікробіологія з вірусологією та імунологією*. – К.: Вища школа., 1992. – 433 С.
8. Сазыкин Ю. О. *Антибиотики как ингибиторы биохимических процессов*. – М.: Наука., 1968. – 448 С.

Отримано: 14 січня 2007 р.

Прийнято до друку: 8 лютого 2007 р.