

УДК: 576.851.252.097.22:615.33:615.849.19

ВПЛИВ ЛАЗЕРНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НИЗЬКОЇ ІНТЕНСИВНОСТІ НА АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНІСТЬ КУЛЬТУРИ ЗОЛОТИСТОГО СТАФІЛОКОКУ

Пантьо В. В., Ніколайчук В. І.

Вплив лазерного випромінювання низької інтенсивності на антибіотикорезистентність культури золотистого стафілококу. — В. В. Пантьо, В. І. Ніколайчук. — У статті наводяться результати досліджень по вивченню впливу низькоінтенсивного лазерного випромінювання червоного та ближнього інфрачервоного спектру на чутливість до антибактеріальних препаратів музейного штаму золотистого стафілококу (ATCC 25923 (F-49)). Досліди проводилися диско-дифузійним методом та методом серійних розведень. Виявлено, що низькоінтенсивне лазерне випромінювання (НЛІВ) як червоного так і інфрачервоного діапазону збільшує чутливість золотистого стафілококу ATCC 25923 (F-49) до всіх антибіотиків, які були використані у досліджах. Встановлено також, що на ефект дії НЛІВ впливає експозиція (доза) випромінювання і найкращі результати були отримані за трихвилинного опромінення культури.

Ключові слова: стафілокок, антибіотик, лазер.

Адреса: Ужгородський національний університет, кафедра генетики, фізіології рослин та мікробіології; 88000, Україна, м. Ужгород, вул. Щедрина 50; тел/факс: (0312)644-615; e-mail: pantyo@mail.uzhgorod.ua

Influence of the laser radiation of low intensity on antibiotic resistance of the Staphylococcus aureus culture — V. Pantyo, V. Nikolaychuk. — The article presents results of researches, devoted to study of influence of the low-intensive laser radiation of red and infrared spectrum on sensibility of museum strain of the Staphylococcus aureus (ATCC 25923 (F-49)) to antibacterial agents. The disk-diffusive and the serial dilution methods were used. Explored, that low-intensive laser radiation (LILR) of red and infrared spectrum increase sensibility of the Staphylococcus aureus ATCC 25923 (F-49) to all antibiotics used in researches. Also revealed that exposure dose has an influence on the effect of the LILR and the best results observed with exposure dose equal 3 minutes.

Keywords: Staphylococcus, antibiotic, laser.

Address: Uzhgorod national university; department of genetics, phytophysiology and microbiology; 88000, Ukraine, Uzhgorod, str. Shchedrina 50; Tel/fax (0312) 644-615; e-mail: pantyo@mail.uzhgorod.ua

Вступ

Протягом усієї своєї історії людство потерпало від різноманітних інфекційних захворювань, які будучи однією з провідних причин смертності забрали мільйони людських життів. Навіть після встановлення того, що інфекцію викликають хвороботворні мікроорганізми, довгий час не існувало ефективних засобів для їх лікування.

Прогрес у лікуванні інфекційних захворювань настав лише тоді, коли вчені навчилися використовувати у своїх цілях таке явище, як антибіоз (антагонізм) бактерій. Останній полягає у тому, що бактерії, як і інші живі істоти, змушені вести між собою боротьбу за існування. Основною зброєю у цій боротьбі є спеціальні речовини, які виробляються одними видами бактерій та згубно впливають на інші види. Саме ці речовини називають антибіотиками [5, 7].

1929 року англійський мікробіолог А. Флемінг відкрив перший антибіотик – пеніцилін. Це стало одним із найбільш видатних відкриттів XX століття, яке ознаменувало початок нової ери у біології та медицині – ери антибіотиків [6].

Проте, дуже скоро виявилось, що святкувати перемогу над хвороботворними мікроорганізмами рано, перемога людини над природою виявилась ілюзорною. Більше того, питання боротьби людини та мікроорганізмів набуло несподіваної драматичної гостроти.

Масове та безконтрольне, а часто і неправильне використання антибіотиків, яке має місце протягом останніх десятиліть, призвело до прискорення мутацій та виникнення стійких бактерій у небачених раніше масштабах [7, 10].

Процес збільшення стійких штамів мікроорганізмів до антибіотиків, які широко використовуються у клініці, погіршив результати лікування зокрема стафілококових інфекцій. Проблему 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 [4, 5].

Через це вчені почали акцентувати увагу на альтернативних методах боротьби з інфекційними агентами, серед яких певне місце посідає і використання фізичних факторів, зокрема і лазерного випромінювання.

Дія лазерного (монохроматичного) випромінювання на клітини, тканини та організм людини та тварин 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 клітин та організму в цілому [1, 2, 3, 8, 9].

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 антибактеріальних препаратів та фізичних факторів?

Матеріали та методи дослідження

Об'єкт дослідження – золотистий стафілокок (*Staphylococcus aureus*) виявлений Р. Кохом, виділений із гною фурункула Л. Пастером (1880), описаний як збудник багатьох гнійних процесів. Стафілококи – рід мікроорганізмів, в межах якого налічуються 27 видів, при цьому 14 видів знайдено на шкірі та слизових оболонках людини.

Стафілококи характеризуються порівняно високою чутливістю до висушування, заморожування, дії сонячного світла та хімічних речовин (у висушеному стані життєздатні більше шести місяців, у пилюці – 50–100 днів). Повторне заморожування та розморожування не вбиває стафілококів [4, 5, 7].

При дії прямих сонячних променів стафілококи не гинуть протягом багатьох годин. Стафілококова інфекція може витримувати нагрівання при температурі 70°C більше години. При температурі 80°C стафілококи гинуть через 10–60 хвилин, від кип'ятіння – миттєво; 5% розчин фенолу вбиває стафілококів протягом 15–30 хвилин [5].

Досліджено чутливість до антибіотиків музейного штаму золотистого стафілококу ATCC 25923 (F-49) до та після опромінення низькоінтенсивним лазерним випромінюванням (НЛВ) дисконфузійним методом та методом серійних розведень. Після опромінення, чутливість культури до тих самих антибіотиків ми визначали шляхом пересіву на поживне середовище для визначення уразливості мікроорганізмів до антибіотиків (середовище АГВ/AGV) із наступним нанесенням мембранних дисків.

Паралельно визначали чутливість до антибіотиків опроміненої та контрольної культур, висіяних у цукровий бульйон, методом серійних розведень. При цьому виділяли останню пробірку з повною затримкою росту мікробів. Концентрація антибіотиків у цій пробірці є мінімальною інгібуючою концентрацією (МІК) для досліджуваного штаму і визначає ступінь його чутливості до даного антибіотика.

Джерелами червоного (довжина хвилі 635 нм, потужність 15 мВт) та інфрачервоного (довжина

хвилі 870 нм, потужність 15 мВт) лазерного випромінювання були вітчизняні лазери "Ліка-терапевт" (рис. 1) та МІТ-1 (рис. 2), серія "ЛІКА". Використовували експозиції 3, 6 та 10 хв. Важливо відзначити, що під час опромінення мікроорганізми знаходилися на початку логарифмічної (експоненціальної) фази росту.

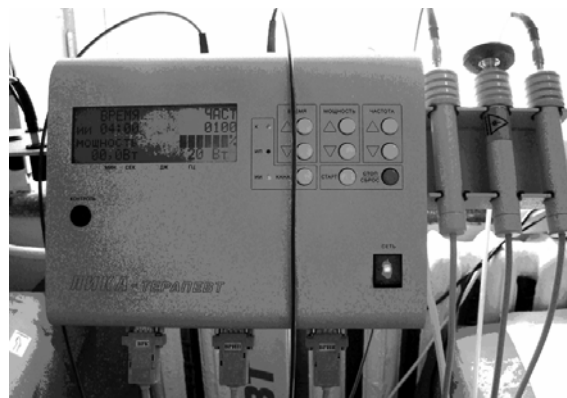


Рис. 1. Діодний лазер "Ліка-терапевт"



Рис. 2. Інфрачервоний діодний лазер (МІТ-1, серія "ЛІКА").

Чутливість мікрофлори визначалась до слідуєчих антибактеріальних препаратів: цефатаксим, ампіцилін, оксацилін, гентаміцин.

Результати та їх обговорення

В результаті проведених досліджень виявлено значні зміни чутливості до антибіотиків об'єкта дослідження. При оцінюванні результатів дослідження, який проводили методом дифузії в агар, визначали діаметр зон затримки росту мікроорганізмів навколо дисків, включаючи діаметр самого диску. Після опромінення низькоінтенсивними лазерами дані зони збільшувалися, а їхні розміри залежали від експозиції опромінення. Найбільш це було виражено за трихвилинного опромінення (таблиця 1).

Так, чутливість опроміненої червоним НЛВ (при експозиції 3 хвилини) культури до цефатак-

сіму зросла у понад 1,2 рази, а до гентаміцину – у 1,3 рази. Відзначимо також значне збільшення чутливості опроміненої мікрофлори до напівсинтетичних антибіотиків пеніцилінового ряду – оксациліну та ампіциліну. Зокрема, трихвилинне опромінення червоним НЛІВ досліджуваного штаму золотистого стафілококу підвищило його чутливість до оксациліну – у понад 1,2 рази, а до ампіциліну майже у 1,6 разів порівняно з контролем.

При використанні червоного та інфрачервоного лазерів отримані схожі результати, які несуттєво відрізнялися один від одного. Різниця діаметрів зон затримки росту опроміненої та контрольної культур статистично достовірна. Оцінюючи результати дослідів, які проводили методом серійних розведень ми виявили, що МІК оксациліну знизилася з 0,5 мкг/мл у контрольній культурі золотистого стафілококу до 0,25 мкг/мл в опроміненій культурі (табл. 2).

Таблиця 1. Діаметр (мм, $M \pm m$) зон затримки росту при лазерному опроміненні культури *Staphylococcus aureus*

Антибіотик	Контроль (n=20)	Експозиція 3 хв. (n=20)		Експозиція 6 хв. (n=20)		Експозиція 10 хв. (n=20)	
		червоний лазер	інфра-червоний лазер	червоний лазер	інфра-червоний лазер	червоний лазер	інфра-червоний лазер
Цефатаксім	23,7±0,2	29,5±0,5 (P ₁ <0,05)	29,9±0,4 (P ₁ <0,001)	27,1±0,4 (P ₂ <0,05)	26,4±0,5 (P ₂ <0,05)	25,1±0,3 (P ₃ <0,05)	24,3±0,2 (P ₃ >0,05)
Ампіцилін	19,1±0,3	30,6±0,6 (P ₁ <0,001)	26,2±0,3 (P ₁ <0,05)	27,8±0,3 (P ₂ <0,05)	24,7±0,3 (P ₂ >0,05)	25,5±0,4 (P ₃ <0,05)	22,1±0,2 (P ₃ >0,05)
Гентаміцин	21,8±0,4	28,5±0,3 (P ₁ <0,001)	26,4±0,5 (P ₁ <0,05)	26,3±0,4 (P ₂ <0,05)	25,7±0,2 (P ₂ <0,05)	23,3±0,2 (P ₃ >0,05)	22,6±0,3 (P ₃ >0,05)
Оксацилін	22,2±0,2	26,6±0,4 (P ₁ <0,05)	26,1±0,4 (P ₁ <0,05)	23,6±0,2 (P ₂ >0,05)	25,2±0,3 (P ₂ <0,05)	22,6±0,3 (P ₃ >0,05)	23,4±0,2 (P ₃ >0,05)

Примітка: P₁ – достовірність різниці між 3-хвилинною експозицією та контролем; P₂ – достовірність різниці між 6-хвилинною експозицією та контролем; P₃ – достовірність різниці між 10-хвилинною експозицією та контролем

Таблиця 2. Зміна мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) оксациліну при опроміненні культури *Staphylococcus aureus*

№ пробірки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Концентрація а/б, мкг/мл	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
Контроль	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Опромінена культура	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Примітка: "-" – відсутність росту (прозоре середовище); "+" – наявність росту (помутніння)

Висновки

Таким чином, можна констатувати, що низькоінтенсивне лазерне випромінювання як червоного так і інфрачервоного діапазону збільшує чутливість золотистого стафілококу ATCC 25923 (F-49) до всіх антибіотиків, які були використані у досліді. При цьому ефект впливу низькоінтенсивних лазерів є дозозалежним і найкращий результат ми отримали при трихвилинному опроміненні, за якого чутливість досліджуваного штаму збільшилася від 20 до 60 %.

1. Безлепкина Н. А., Коробов А. М. Молекулярно-мембранні механізми впливу низькоінтенсивного лазерного випромінювання на біоб'єкти. // Матеріали XIV Міжнародної науково-практичної конференції «Применение лазерів в медицині та біології». – Харків. – 2000. – С. 6.
2. Бриль Г. Е. Некоторые методологические аспекты изучения биологических эффектов низькоінтенсивного лазерного випромінювання // Фотобіологія та фотомедицина. 2007 – Т. V, № 1. – С. 5 – 13.
3. Гримбатов В. М. Современная аппаратура и проблемы низькоінтенсивной лазерной терапии // Применение лазерів в біології та медицині. – Киев, 2004. – С. 123 – 127.
4. Дорофеев Д. А. Чувствительность штаммов золотистого стафілококка к антибиотикам у детей с различным количеством лимфоцитов // Український медичний альманах. – 2005 – № 4 – С. 58 – 59.

5. Коротаев А. И., Бабичев С. А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. – СПб.: Спец лит, 2002. – 591 с.
6. Машковский М. Д. Лекарственные средства: В 2-х томах. Т. 2. – М.: Медицина, 1988. – С. 199 – 265.
7. Сазыкин Ю. О. Антибиотики как ингибиторы биохимических процессов. – М.: Наука., 1968. – 448 с.
8. Самойлов М. Г. Сучасний стан проблеми дослідження механізму дії низькоінтенсивного лазерного випромінювання. // Фотобіологія та фотомедицина. – Харків. – 2000. – № 1 – 2. – С. 76 – 83.
9. Karu T. Low-power laser therapy // Biomedical Photonics Handbook. – 2003. – CRC Press LLC/ – P/48–1 – 48 – 25.
10. Sarda J. N. et al. Antibiotic prophylaxis in surgery. // Med. Clin. (Barc.). – 1994. – Vol. 102, № 1. – P. 38 – 40.

Отримано: 10 грудня 2009 р.

Прийнято до друку: 4 лютого 2010 р.