© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 615.849.19.03:616-022.7

DOI 10.21292/2075-1230-2017-95-8-63-66

ВЛИЯНИЕ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ДЛИНОЙ ВОЛНЫ 662 HM HA POCT MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS IN VITRO

 \mathcal{A} . А. БРЕДИХИН 2 , С. \mathcal{A} . НИКОНОВ 1,2 , А. Г. ЧЕРЕДНИЧЕНКО 1,2 , Т. И. ПЕТРЕНКО 1,3 , А. В. ИВАНЕНКО 2 , М. М. МИРЗОЕВ 2

¹ФГБУ «Новосибирский НИИ туберкулеза» МЗ РФ, г. Новосибирск, Россия

 2 ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет (НГУ)», г. Новосибирск, Россия

³ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» МЗ РФ, г. Новосибирск, Россия

Цель исследования: установить in vitro влияние различных доз лазерного излучения длиной волны 662 нм на ростовые свойства M. tuberculosis.

Материалы и методы. Воздействие на образцы микобактериальной взвеси *M. tuberculosis* H₃₇Rv осуществляли непрерывным монопозиционным световым излучением (λ = 662 нм) в шести режимах дозирования, зависящих от мощности и длительности светового воздействия. Инокуляция всех образцов суспензий микобактерий туберкулеза осуществлялась на плотные питательные среды Левенштейна – Йенсена в триплетах для каждой дозы светового воздействия. Инкубация посевов осуществлялась при 37°C в течение 90 дней с еженедельным пересмотром образцов.

Результаты. Непрерывное излучение полупроводникового лазера с длиной волны 662 нм обладает наиболее выраженными бактериостатическими и бактерицидными эффектами в отношении *M. tuberculosis* H₃₇Rv при плотности дозы энергии 234,5 и 703,5 Дж/см². Такая доза была получена при 5- и 15-минутной экспозиции соответственно.

Ключевые слова: микобактерия туберкулеза, лазерное излучение, длина волны 662 нм

Для цитирования: Бредихин Д. А., Никонов С. Д., Чередниченко А. Г., Петренко Т. И., Иваненко А. В., Мирзоев М. М. Влияние лазерного излучения длиной волны 662 нм на рост *Mycobacterium tuberculosis in vitro* // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2017. – Т. 95, № 8. – С. 63-66. DOI: 10.21292/2075-1230-2017-95-8-63-66

EFFECT OF LASER RADIATION WITH 662 NM WAVE ON THE GROWTH OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS IN VITRO

D. A. BREDIKHIN², S. D. NIKONOV¹², A. G. CHEREDNICHENKO¹², T. I. PETRENKO¹³, A. V. IVANENKO², M. M. MIRZOEV²

¹Novosibirsk Tuberculosis Research Institute, Novosibirsk, Russia

²Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

Goal of the study: to define the effect of various doses of laser radiation with 662 nm wave on the growth of M. tuberculosis in vitro.

Materials and methods. Samples of mycobacterial suspension of M. tuberculosis H_{37} Rv were processed by monopositional light radiation (λ = 662 nm) in six dosing regimens varying in power and duration of the exposure to the light. All samples of mycobacterial suspension of M. tuberculosis were inoculated on the solid nutritional media of Lowenstein-Jensen in triplets for each dose of the exposure to light. Cultures were incubated under 37°C for 90 days with weekly inspection of samples.

Results. Continuous irradiation by diffused laser with 662 nm wave provides the most expressed bacteriostatic and bactericidal effects against M.tuberculosis H $_{37}$ Rv under the density of the energy dose of 234.5 and 703.5 of J/sq.cm. Such a dose was obtained through 5 and 15-minute exposure respectively.

Key words: tuberculous mycobacteria, laser radiation, wave 662 nm long

For citations: Bredikhin D.A., Nikonov S.D., Cherednichenko A.G., Petrenko T.I., Ivanenko A.V., Mirzoev M.M. Effect of laser radiation with 662 nm wave on the growth of *Mycobacterium tuberculosis in vitro*. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2017, Vol. 95, no. 8, P. 63-66. (In Russ.) DOI: 10.21292/2075-1230-2017-95-8-63-66

Анализ результатов терапии больных из 45 субъектов РФ в 2012 г. показал, что курс лечения туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя эффективен в 38,1% случаев, а среди пациентов с широкой лекарственной устойчивостью возбудителя — в 25,2% случаев [14], поэтому для повышения эффективности лечения больных туберкулезом легких актуален поиск новых немедикаментозных способов подавления жизнедеятельности *М. tuberculosis* (МБТ). Одним из таких способов является фототерапия.

Во фтизиатрии впервые лечение светом применил Niels Ryberg Finsen при туберкулезной волчанке [12], а затем туберкулезе кожи, туберкулезном плеврите и костном туберкулезе, используя ультрафиолетовое излучение дуговой угольной лампы. В 1903 г. он был удостоен Нобелевской премии по физиологии и медицине «в знак признания заслуг в деле лечения болезней — особенно волчанки — с помощью концентрированного светового излучения, что открыло перед медицинской наукой новые широкие горизонты» [13].

С развитием научно-технического прогресса появились новые источники света. Возвращение интереса к фототерапии связано с изобретением в 1960 г. Theodore Harold Maiman оптического квантового генератора — лазера на кристалле рубина [14].

Ингибирующее действие низкоэнергетического лазерного излучения на МБТ изучалось в России в 90-е годы. Выполнено значительное количество исследований *in vitro*, и установлено, что энергия гелий-неонового лазера дозозависимо угнетает рост лабораторного штамма микобактерий туберкулеза H₃₇Rv и снижает его вирулентность для морских свинок [5]. Излучение гелий-неонового лазера приводило к разрушению и последующему исчезновению капсульного покрова микобактерий и к необратимым изменениям в виде разрушения клеточной стенки, дезорганизации рибосом, коагуляции нуклеоида [8]. При однократном облучении МБТ гелий-неоновым лазером с длиной волны 630 нм достигался умеренный бактериостатический эффект [2]. Действие гранатового лазера при длине волны 890 нм оказывает выраженное бактериостатическое действие и в 50% случаев является бактерицидным [7]. Коротковолновое электромагнитное излучение в ультрафиолетовом спектре при длине волны 330 нм и в зеленом спектре при длине волны 510 нм также обладает бактериостатическим, а в 25% случаев бактерицидным эффектом. При изучении действия ультрафиолетового лазерного излучения с длиной волны 248 нм в опытах *in vitro* с культурой МБТ при дозе облучения 10 мВт/см² получен статистически достоверный бактерицидный эффект [3].

В отечественной научной литературе представлены единичные клинические исследования по воздействию ультрафиолетового лазерного излучения. Так, на этапе предоперационной подготовки больных с прогрессирующим фиброзно-кавернозным туберкулезом легких трансторакально осуществлялось эндокавитарное облучение ультрафиолетовым лазером. Это способствовало ускорению в 1,6 раза стабилизации процесса, уменьшало в 1,9 раза число послеоперационных осложнений, что суммарно повысило клиническую эффективность хирургического лечения в 1,5 раза [4]. Успешно применялось ультрафиолетовое лазерное излучение с длиной волны 248 нм и при эндоскопическом лечении туберкулеза бронхов [9] и неспецифических бронхитов у больных туберкулезом [11].

О возрождении научного интереса к изучению действия лазерной энергии на МБТ свидетельствует появление новых данных о подавлении роста лекарственно-устойчивых штаммов МБТ *in vitro* при 20- и 40-минутном воздействии низкоинтенсивного лазерного излучения длиной волны 660 нм при мощности 24 мВт [10].

Цель исследования: установить *in vitro* влияние различных доз лазерного излучения длиной волны 662 нм на ростовые свойства МБТ.

Материалы и методы

Объект исследования: музейный штамм МБТ ₁₋₂Rv.

С помощью стандартного метода нефелометрии (Sensititre Nephelometer (TREK Diagnostic Systems), Великобритания) готовили взвесь МБТ H_{37} Rv с бактериальным числом 3×10^7 микробных тел/мл. Затем взвесь МБТ разделяли на семь проб: шесть – для воздействия разными дозами световой энергии, одну – для контроля (К). Каждую пробу бактериальной взвеси разделили на три образца объемом 0,2 мл.

Световое воздействие на образцы микобактериальной взвеси осуществляли непрерывным монопозиционным световым излучением полупроводникового генератора Лахта Милон с длиной волны 662 нм (λ = 662 нм). Для воздействия было выбрано шесть режимов, зависящих от мощности и длительности светового воздействия: 46,9; 93,75; 140,6; 234,5; 468,75; 703,5 Дж/см². Контрольные образцы взвеси МБТ световой обработке не подвергались.

Инокуляция всех образцов суспензий МБТ осуществлялась на плотные питательные среды Левенштейна — Йенсена в триплетах для каждой дозы светового воздействия. Инкубация посевов выполнялась при 37°С в течение 90 дней с еженедельным пересмотром образцов.

Результаты исследования

Обнаружено, что лазерное световое воздействие с длиной волны 662 нм оказывает ингибирующее действие на ростовые свойства музейного штамма МБТ $\rm H_{37}Rv$, что проявляется дозозависимой задержкой роста колоний от 6 до 16 сут. Действие лазерного излучения длиной волны 662 нм проявляется и уменьшением (10-12-кратное снижение) количества выросших колоний МБТ по мере увеличения плотности световой энергии от 46,9 до 703,5 Дж/см² (табл.).

Выявленные эффекты воздействия на МБТ лазерной энергии могут быть обусловлены наличием в МБТ молекул эндогенных порфиринов. Внутриклеточные порфирины встроены в структуру некоторых белковых молекул митохондрий и образуются в процессе жизнедеятельности клетки.

Наличие повышенных значений порфиринов в крови больных туберкулезом было положено в основу ранней лазерной флюоресцентной диагностики туберкулезной инфекции [1, 6]. Порфирины — природные фотосенсибилизаторы, имеющие полосы поглощения электромагнитного излучения в диапазоне от 400 до 900 нм, а также в инфракрасном спектре 1 000-1 550 нм. С учетом этих данных использовали излучение с длиной волны 662 нм, соответствующее пиковым значениям поглощения световой энергии порфиринами. Механизм повреждающего действия лазерного излучения на МБТ может выглядеть сле-

Таблица. Эффекты воздействия разных доз лазерного излучения λ = 662 нм на МБТ по данным их посева на плотные среды Левенштейна – Йенсена

Table. Effect of exposure of various doses of laser radiation with λ = 662 nm on M. tuberculosis according to the data received during its inoculation on solid media of Lowenstein-Jensen

Проба	Р _ь , Вт	Т, мин	W _s , Дж/см²	День регистрации роста культуры	Количество колоний, х± σ
К	-	-	-	20	> 100
1	0,1	5	46,9	26-33	35,33 ± 18,66
2	0,1	10	93,75	33-36	22,33 ± 3,39
3	0,1	15	140,6	26-33	10,00 ± 4,32
4	0,5	5	234,5	33	8,33 ± 0,47
5	0,5	10	468,75	26-33	13,00 ± 5,35
6	0,5	15	703,5	33-36	9,33 ± ,86

Примечание: К – контрольная проба (3 образца);

1-6 опытные пробы (по 3 образца каждая);

 $\overline{x}\,\pm\sigma$ — среднее значение с квадратичным отклонением (по 3 образцам пробы).

 $\boldsymbol{P}_{_{b}}$ – мощность лазерного излучения; T – длительность лазерного воздействия; $\boldsymbol{W}_{_{S}}$ – плотность дозы светового излучения

дующим образом. Энергия фотонов лазерного излучения, поглощенная молекулами порфиринов в клеточных органеллах МБТ, возбуждает порфирины до триплетного состояния, находясь в котором молекулы вступают в фотохимические реакции двух типов. При первом типе реакций происходит взаимодействие возбужденных молекул с молекулами внутриклеточных органелл, ДНК с генерацией токсичных радикалов. При втором типе реакций возбужденные молекулы порфиринов взаимодействуют с растворенным внутриклеточным кислородом с образованием синглетного кислорода, который вызывает внутриклеточный окислительный стресс и летальные цитотоксические эффекты [15, 16].

Заключение

Непрерывное излучение полупроводникового лазера с длиной волны 662 нм обладает предельными бактериостатическими и бактерицидными эффектами в отношении МБТ при плотности энергии 234,5 и 703,5 Дж/см², для достижения такой плотности понадобилась экспозиция в 5 и 15 мин соответственно, что делает этот вид излучения перспективным для дальнейшего изучения в плане клинического применения.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов. **Conflict of Interests.** The authors state that they have no conflict of interests.

ЛИТЕРАТУРА

- Александров М. Т., Иванова М. А., Васильев Е.В., Хоменко В. А., Гапоненко О. Г. Лазерно-флуоресцентная медицинская технология исследования спектральных характеристик различных микобактерий и ее клиническая апробация // Лазерная клиническая биофотометрия. М.: Техносфера, 2008. С. 460-477.
- 2. Гуляев А. А. Влияние излучения гелий-неонового лазера на заживление ран у здоровых и зараженных туберкулезом животных: Дис. ... канд. мед. наук. М., 1997. 213 с.
- Добкин В. Г., Еремеев В. В., Кузьмин Г. П., Багиров М. А., Файзуллин Д. Р. Действие ультрафиолетового лазерного излучения на внеклеточные и фагоцитированные микобактерии туберкулеза in vitro // Пробл. туб. – 2002. – № 12. – С. 56-58.
- Добкин В. Г., Файзуллин Д. Р., Кузьмин Г. П., Башкин В. К. Облучение стенок каверны ультрафиолетовым лазером (λ = 248 нм) как метод локального лечения прогрессирующего фиброзно-кавернозного туберкулеза // Лазерная медицина. 2004. Т. 8, № 3 С. 27.
- 5. Должанский В. М., Калюк А. Н., Малиев Б. М., Левченко Т. Н. Влияние низкоэнергетического гелий-неонового лазера на биологические свойства микобактерий туберкулеза // Пробл. туб. 1990. N 4. С. 11-14.
- Иванова М. А., Макарова М. В., Васильев Е. В., Александров М. Т., Пашков Е. П. Ускоренная идентификация микобактерий с помощью лазерной флюоресценции // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2009. – № 3. – С. 81-85.
- Калюк А. Н., Зарбуев А. Н., Путилина Л. П., Сорокина И. А. Воздействие низкоинтенсивного гранатового лазерного излучения на микроорганизмы и раны // Пробл. туб. – 1992. – № 1. – С. 53-55.
- Левченко Т. Н. Анатомия микобактерий туберкулеза в норме и в условиях применения новых методов патогенетической терапии: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 1992. – 21 с.
- 9. Ловачева О. В., Шумская И. Ю., Сидорова Н. Ф., Евгущенко Г. В., Никитин А. В. Использование эндобронхиального лазерного ультрафиолетового излучения в комплексном лечении туберкулеза бронхов // Пробл. туб. 2006. № 12. С. 20-24.

REFERENCES

- Aleksandrov M.T., Ivanova M.A., Vasiliev E.V., Khomenko V.A., Gaponenko O.G. Lazerno-fluorestsentnaya meditsinskaya tekhnologiya issledovaniya spektralnykh kharakteristik razlichnykh mikobakteriy i ee klinicheskaya aprobatsiya. Lazernaya klinicheskaya biofotometriya. [Laser fluorescent medical technology for tetanig spectral characteristics of various mycobacteria and its clinical pilot use. Laser clinical biophotometry]. Moscow, Techosfera Publ., 2008, pp. 460-477.
- Gulyaev A.A. Vliyanie izlucheniya geliy-neonovogo lazera na zazhivlenie ran u zdorovykh i zarazhennykh tuberkulezom zhivotnykh. Diss. kand. med. nauk. [Effect of helium-neon laser radiation of the wounds repair in healthy animals and those infected with tuberculosis. Cand. Diss.]. Moscow, 1997, 213 p.
- Dobkin V.G., Eremeev V.V., Kuzmin G.P., Bagirov M.A., Fayzullin D.R. Effect
 of ultraviolet laser radiation on the extracellular and phagocytic tuberculous
 mycobacteria in vitro. *Probl. Tub.*, 2002, no. 12, pp. 56-58. (In Russ.)
- Dobkin V.G., Fayzullin D.R., Kuzmin G.P., Bashkin V.K. Radiation of cavity walls with ultraviolet laser (λ = 248 nm) as local treatment of progressing fibrous cavernous tuberculosis. *Lazernaya Meditsina*, 2004, vol. 8, no. 327, pp. 27 (In Russ.)
- Dolzhanskiy V.M., Kalyuk A.N., Maliev B.M., Levchenko T.N. Effect of low-energy helium-neon laser on the biological properties of tuberculous mycobacteria. *Probl. Tub.*, 1990, no. 4, pp. 11-14. (In Russ.)
- Ivanova M.A., Makarova M.V., Vasiliev E.V., Aleksandrov M.T., Pashkov E.P. Express identification of mycobacteria by laser fluorescence. *Journal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunologii*, 2009, no. 3, pp. 81-85. (In Russ.)
- Kalyuk A.N., Zarbuev A.N., Pugiliia L.P., Sorokina I.A. Effect of low-intensity Nd:YAG laser on microorganisms and wounds. *Probl. Tub.*, 1992, no. 1, pp. 53-55. (In Russ.)
- 8. Levchenko T.N. *Anatomiya mikobakteriy tuberkuleza v norme i v usloviyakh primeneniya novykh metodov patogeneticheskoy terapii. Diss. kand. biol. nauk.* [Anatomy of tuberculous mycobacteria in norm and while using new methods of pathogenetic therapy. Cand. Diss.] Moscow, 1992, 21 p.
- Lovacheva O.V., Shumskaya I.Yu., Sidorova N.F., Evgushhenko G.V., Nikitin A.V. Use of endobronchial laser ultraviolet radiation in the comprehensive treatment of bronchial tuberculosis. *Probl. Tub.*, 2006, no. 12, pp. 20-24. (In Russ.)

- Скворцова В. В., Брилль Г. Е., Манаенкова Е. В. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на рост лекарственно-устойчивых штаммов микобактерий туберкулеза // Бюллетень медицинских интернет-конференций. 2015. Т. 5, № 5 С. 648.
- 11. Черниховская Н. Е., Гейниц А. В., Ловачева О. В., Поваляев А. В. Лазеры в эндоскопии. М.: МЕДпресс-информ, 2011. 142 с.
- Finsen N. Om bekæmpelseaf Lupus Vulgaris, med en radegørelse for de i Danmark opanaæde resultater. Copenhagen: Gyldendalske Boghan-dels Forlag; 1902. – P. 3-10.
- Finsen N. R. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1903. See http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1903/
- Maiman T. H. Stimulated optical radiation in ruby // Nature. № 187 (4736) P. 493-494.
- Mik E. G., Johannes T., Zuurbier C. J., Heinen A., Houben-Weerts J. H., Balestra G. M., Stap J., Beek J. F., Ince C. In vivo mitochondrial oxygen tension measured by a delayed fluorescence lifetime technique // J. Biophys. – 2008. – Vol. 95, No. 8. – P. 3977-3990.
- Turrens J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species // J. Physiol. 2003. – Vol. 552. – P. 335-344.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет (НГУ)», 630082, г. Новосибирск, ул. Вавилова, д. 14.

Бредихин Демид Александрович

инженер лаборатории биомедицинских применений квантовых материалов, устройств и систем Междисциплинарного квантового центра. E-mail: demid87@yandex.ru

Никонов Сергей Данилович

доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией биомедицинских применений квантовых материалов, устройств и систем Междисциплинарного квантового центра.

Тел.: 8 (383) 225-59-81. E-mail: sibnovomed@mail.ru

Чередниченко Андрей Георгиевич

старший инженер лаборатории биомедицинских применений квантовых материалов, устройств и систем Междисциплинарного квантового центра.

Тел.: 8 (383) 203-83-62. E-mail: bact.nniit@gmail.com

Иваненко Алексей Владимирович

кандидат физико-математических наук, научный сотрудник отдела лазерной физики и инновационных технологий.

E-mail: ivanenko.aleksey@gmail.com

Мирзоев Мирзобахадур Мирзохамдамович

студент института медицины и психологии. E-mail: mirzo3383@gmail.com

Петренко Татьяна Игоревна

ГБОУ ВО «ННИИТ» МЗ РФ,

доктор медицинских наук.

630040, г. Новосибирск, ул. Охотская, д. 81A.

Тел.: 8 (383) 203-83-58. E-mail: tpetrenko@nsk-niit.ru

Поступила 24.04.2017

- Skvortsova V.V., Brill G.E., Manaenkova E.V. Effect of low-intensity of laser radiation in the growth of drug resistant strains of Mycobacterium tuberculosis. Bulleten Meditsinskikh Internet Konferentsiy, 2015, vol. 5, no. 5, pp. 648. (In Russ.)
- Chernikhovskaya N.E., Geynits A.V., Lovacheva O.V., Povalyaev A.V. Lazery v endoskopii. [Laser in endoscopy]. Moscow, MEDpress-inform Publ., 2011, 142 p.
- Finsen N. Om bekæmpelseaf Lupus Vulgaris, med en radegørelse for de i Danmark opanaaede resultater. Copenhagen, Gyldendalske Boghan-dels Forlag, 1902, pp. 3-10.
- Finsen N.R. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1903. See http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1903/
- Maiman T.H. Stimulated optical radiation in ruby. Nature, no. 187 (4736), pp. 493-494.
- Mik E.G., Johannes T., Zuurbier C.J., Heinen A., Houben-Weerts J.H., Balestra G.M., Stap J., Beek J.F., Ince C. In vivo mitochondrial oxygen tension measured by a delayed fluorescence lifetime technique. *J. Biophys.*, 2008, vol. 95, no. 8, pp. 3977-3990.
- Turrens J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J. Physiol., 2003, vol. 552, pp. 335-344.

FOR CORRESPONDENCE:

Novosibirsk State University, 14, Vavilova St., Novosibirsk, 630082

Demid A. Bredikhin

Engineer of Laboratory for Use of Quantum Materials, Devices and Systems within Cross-Disciplinary Quantum Center

Email: demid87@yandex.ru

Sergey D. Nikonov

Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of Laboratory for Use of Quantum Materials, Devices and Systems within Cross-Disciplinary Quantum Center.

Phone: +7 (383) 225-59-81. Email: sibnovomed@mail.ru

Andrey G. Cherednichenko

Senior Engineer of Laboratory for Use of Quantum Materials, Devices and Systems within Cross-Disciplinary Quantum Center.

Phone: +7 (383) 203-83-62. Email: bact.nniit@gmail.com

Aleksey V. Ivanenko

Candidate of Physico-Mathematical Sciences, Researcher of Laser Physics and Innovative Technologies Department. Email: ivanenko.aleksey@gmail.com

Mirzobakhadur M. Mirzoev

Student of Medicine and Psychology Institute. Email: mirzo3383@gmail.com

Tatiana I. Petrenko

Novosibirsk Research TB Institute, Doctor of Medical Sciences. 81a, Okhotskaya St., Novosibirsk, 630040. Phone: +7 (383) 203-83-58.

Phone: +7 (383) 203-83-58. Email: tpetrenko@nsk-niit.ru

Submitted as of 24.04.2017