

ВЛИЯНИЕ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ДЛИНОЙ ВОЛНЫ 662 НМ НА РОСТ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* *IN VITRO*

Д. А. БРЕДИХИН², С. Д. НИКОНОВ^{1,2}, А. Г. ЧЕРЕДНИЧЕНКО^{1,2}, Т. И. ПЕТРЕНКО^{1,3}, А. В. ИВАНЕНКО², М. М. МИРЗОЕВ²

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

²ФГАОУ 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 ($\lambda = 662$ 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* // Туберкулез 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. NIKONOV^{1,2}, A. G. CHEREDNICHENKO^{1,2}, T. I. PETRENKO^{1,3}, 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* H₃₇Rv were processed by monopositional light radiation ($\lambda = 662$ 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* H₃₇Rv 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 *M. 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].

Материалы и методы

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.

Объект исследования: музейный штамм МБТ H₃₇Rv.

С помощью стандартного метода нефелометрии (Sensititre Nephelometer (TREK Diagnostic Systems), Великобритания) готовили взвесь МБТ H₃₇Rv 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 ($\lambda = 662$ 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°C 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 H₃₇Rv, 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 флуоресцентной 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 $\lambda = 662$ нм на МБТ по данным их посева на плотные среды Левенштейна – Йенсена

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

Проба	P_b , Вт	T, мин	W_s , Дж/см ²	День регистрации роста культуры	Количество колоний, $\bar{x} \pm \sigma$
К	-	-	-	20	> 100
1	0,1	5	46,9	26-33	35,33 \pm 18,66
2	0,1	10	93,75	33-36	22,33 \pm 3,39
3	0,1	15	140,6	26-33	10,00 \pm 4,32
4	0,5	5	234,5	33	8,33 \pm 0,47
5	0,5	10	468,75	26-33	13,00 \pm 5,35
6	0,5	15	703,5	33-36	9,33 \pm ,86

Примечание: К – контрольная проба (3 образца);

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

$\bar{x} \pm \sigma$ – среднее значение с квадратичным отклонением (по 3 образцам пробы).

P_b – мощность лазерного излучения; T – длительность лазерного воздействия; 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.
- 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 ($\lambda = 248$ нм) как метод локального лечения прогрессирующего фиброзно-кавернозного туберкулеза // Лазерная медицина. – 2004. – Т. 8, № 3 – С. 27.
- 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. – № 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 флуоресценции // 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.
- Ловачева О. В., Шумская И. Ю., Сидорова Н. Ф., Евгушенко 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-fluorescentnaya meditsinskaya tekhnologiya issledovaniya spektralnykh kharakteristik razlichnykh mikobakteriy i ee klinicheskaya aprobatsiya. Lazernaya klinicheskaya biofotometriya*. [Laser fluorescent medical technology for testing 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 zarazhemykh 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 ($\lambda = 248$ nm) as local treatment of progressing fibrous cavernous tuberculosis. *Lazernaya Meditsina*, 2004, vol. 8, no. 327, pp. 27 (In Russ.)
- Dolzanskiy 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.)
- 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., Evgushenko 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.)

10. Скорцова В. В., Бриль 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. Черниковская Н. Е., Гейниц А. В., Ловачева О. В., Поваляев А. В. Лазеры в эндоскопии. – М.: МЕДпресс-информ, 2011. – 142 с.
12. Finsen N. Om bekæmpelse af Lupus Vulgaris, med en radeegørelse for de i Danmark opnaaede resultater. Copenhagen: Gyldendalske Boghandels Forlag, 1902. – P. 3-10.
13. Finsen N. R. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1903. See http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1903/
14. Maiman T. H. Stimulated optical radiation in ruby // Nature. – № 187 (4736) – P. 493-494.
15. 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, № 8. – P. 3977-3990.
16. Turrens J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species // J. Physiol. – 2003. – Vol. 552. – P. 335-344.
10. 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.)
11. 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.
12. Finsen N. Om bekæmpelse af Lupus Vulgaris, med en radeegørelse for de i Danmark opnaaede resultater. Copenhagen, Gyldendalske Boghandels Forlag, 1902, pp. 3-10.
13. Finsen N.R. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1903. See http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1903/
14. Maiman T.H. Stimulated optical radiation in ruby. *Nature*, no. 187 (4736), pp. 493-494.
15. 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.
16. Turrens J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.*, 2003, vol. 552, pp. 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. 81А.
Тел.: 8 (383) 203-83-58.
E-mail: tpetrenko@nsk-niit.ru

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.
Email: tpetrenko@nsk-niit.ru