

УДК 615.849.19.015.44

DOI: 10.17816/pmj37248-53

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ПРОКАРИОТИЧЕСКИЕ И ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ

А.П. Годовалов^{1}, М.В. Яковлев¹, К.А. Батог¹,
М.В. Ременникова², Л.П. Быкова¹, Д.М. Пастухов¹*

*¹Пермский государственный медицинский университет
имени академика Е.А. Вагнера,*

²Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН, Россия

FEATURES OF EFFECT OF LOW-INTENSITY LASER IRRADIATION ON PROKARYOTIC AND EUKARYOTIC CELLS

A.P. Godovalov^{1}, M.V. Yakovlev¹, K.A. Batog¹,
M.V. Remennikova², L.P. Bykova¹, D.M. Pastukhov¹*

¹E.A. Vagner Perm State Medical University,

²Perm Federal Research Center UB RAS, Russian Federation

Цель. Изучить возможность использования светодиодного синего, красного и зеленого излучений аппарата нового образца с целью элиминации прокариотических клеток и сохранения при этом жизнеспособности клеток человека. В настоящее время достаточно широко в медицинской практике применяются лазерные технологии. Однако относительно мало исследований о влиянии лазерного излучения со сходными параметрами на жизнеспособность прокариотических и эукариотических клеток.

Материалы и методы. В качестве генератора излучения применяли диодный медицинский лазер ЛФДТ-02 нового образца Пермской научно-производственной приборостроительной компании. Культуры *Staphylococcus aureus* 66Ж подвергали облучению лазером с различной длиной волны (время экспозиции – 2 мин, мощность – 22 mV). После чего оценивали жизнеспособность микроорганизмов путем прямого посева на питательные среды. Для изучения влияния лазерного излучения на клетки макроорганизма у 17 практически здоровых

© Годовалов А.П., Яковлев М.В., Батог К.А., Ременникова М.В., Быкова Л.П., Пастухов Д.М., 2020

тел. +7 912 98 15 100

e-mail: AGodovalov@gmail.com

[Годовалов А.П. (*контактное лицо) – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник ЦНИЛ, доцент кафедры микробиологии и вирусологии; Яковлев М.В. – студент стоматологического факультета; Батог К.А. – студент стоматологического факультета; Ременникова М.В. – заведующая лабораторией агробиофотоники, научный сотрудник; Быкова Л.П. – кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии и вирусологии; Пастухов Д.М. – студент стоматологического факультета].

© Godovalov A.P., Yakovlev M.V., Batog K.A., Remennikova M.V., Bykova L.P., Pastukhov D.M., 2020

tel. +7 912 98 15 100

e-mail: AGodovalov@gmail.com

[Godovalov A.P. (*contact person) – Candidate of Medical Sciences, Leading Researcher of Central Research Laboratory, Associate Professor of Department of Microbiology and Virusology; Yakovlev M.V. – student, Stomatological Faculty; Batog K.A. – student, Stomatological Faculty; Remennikova M.V. – Head of Laboratory of Agrobiophotonics, Researcher; Bykova L.P. – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of Department of Microbiology and Virusology; Pastukhov D.M. – student, Stomatological Faculty].

добровольцев в возрасте 20–25 лет с интактным пародонтом и зубным рядом, без соматической патологии натошак получали образцы буккального эпителия. Для оценки жизнеспособности клеток использовали витальный краситель – 0,1 % раствор трипанового синего. Время экспозиции и мощность не отличаются от таковых для исследуемого штамма *S. aureus*. Для оценки морфологических изменений эпителиоцитов готовили препараты для микроскопии, которые после фиксации окрашивали по методу Романовского – Гимзе.

Результаты. При оценке действия лазерного излучения, особенно в клинических условиях, необходимо учитывать его возможное влияние не только на клетки условно-патогенных микроорганизмов, но и на клетки человека. В настоящем исследовании показано, что лазерное излучение мощностью 22 мВ позволяет достичь бактериостатического действия в отношении *S. aureus*, но при этом существенно снижается жизнеспособность и буккальных эпителиоцитов, что можно рассматривать, с одной стороны, как побочное действие лазерного излучения, а с другой стороны, удаление отмирающих клеток, наполненных микроорганизмами, может усилить эффект проводимой терапии.

Выводы. На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что лазерное излучение диодного лазера с длиной волны 405 нм (синий) и 650 нм (красный) обладает выраженным бактериостатическим действием. Однако было установлено существенное поражающее действие излучения красного цвета на клетки макроорганизма.

Ключевые слова. Лазерное излучение, жизнеспособность прокариотических и эукариотических клеток, диодный лазер, бактериостатический эффект.

Objective. To study the possibility of using LED blue, red, and green radiations of a new apparatus to eliminate prokaryotic cells and maintain human cell viability.

Currently, laser technologies are widely used in medical practice. However, there are relatively few studies on the effect of laser radiation with similar parameters on the viability of prokaryotic and eukaryotic cells.

Materials and methods. As a radiation generator, the LFDТ-02 diode medical laser of a new type from the Perm Scientific and Production Instrument-Making Company was used. *Staphylococcus aureus* 66G cultures were irradiated with a different wavelengths laser (exposure time – 2 min, power – 22 mV). After that, the viability of microorganisms was evaluated by direct seeding on nutrient media. To study the effect of laser radiation on macroorganism cells, fasting samples of buccal epithelium were obtained in 17 practically healthy volunteers aged 20–25 years with an intact periodontium and dentition, without somatic pathology. To assess cell viability, a vital dye was used – 0.1 % trypan blue solution. The exposure time and power do not differ from those for the studied *S. aureus* strain. To assess the morphological changes of epithelial cells, preparations were prepared for microscopy, which, after fixation, were stained according to the Romanovsky-Giemsa method.

Results. When evaluating the effect of laser radiation, especially in a clinical setting, it is necessary to take into account its possible effect not only on cells of conditionally pathogenic microorganisms, but also on human cells. In the present study, it was shown that laser radiation with a power of 22 mV allows one to achieve a bacteriostatic effect against *S. aureus* but it also significantly reduces the viability of buccal epithelial cells, that can be considered, on the one hand, as a side effect of laser radiation and, on the other hand, the removal of dying cells filled with microorganisms, can enhance the effect of ongoing therapy.

Conclusions. Based on the results obtained, it can be concluded that the laser radiation of a diode laser with a wavelength of 405 nm (blue) and 650 nm (red) has a pronounced bacteriostatic effect. However, a significant damaging effect of red radiation on macroorganism cells was found.

Key words. Laser radiation, viability of prokaryotic and eukaryotic cells, diode laser, bacteriostatic effect, red radiation effect.

ВВЕДЕНИЕ

Высокий темп развития медицины в настоящее время ограничивается рядом факторов, среди которых существенное место

занимает проблема резистентности микроорганизмов к антибиотикам. Кроме того, растет число мультирезистентных штаммов, которые проявляют устойчивость одновременно к нескольким антибиотикам разных

классов [1]. Более того, непросто определить мишень действия антибиотиков в сложно регулируемом сообществе микроорганизмов. Так, полость рта рассматривают как биотоп где создаются условия для обитания консорциума различных видов микроорганизмов. Их более 700 видов, большинство из которых относятся к условно-патогенным. Следствием наличия столь богатой микрофлоры являются заболевания ротовой полости, вызванные в подавляющем большинстве случаев именно совокупностью условно-патогенных микроорганизмов. Спектр средств для снижения микробной обсемененности в настоящее время ограничен как за счет быстро формирующейся антибиотикоустойчивости, так и за счет высоких приспособительных функций микрофлоры, особенно при существовании в составе сообщества. В связи с этим проблема поиска альтернативных методов борьбы с условно-патогенными микроорганизмами не теряет своей актуальности [1].

Одним из развивающихся направлений медицины является использование лазеров. В современной стоматологии широко распространены метод фотодинамической терапии (ФДТ). Данный способ борьбы с микроорганизмами основан на применении фотосенсибилизаторов, облучение которых запускает цепь фотохимических реакций, приводящих к гибели живых клеток. В клинических процедурах ФДТ широко применяются катетеры с цилиндрическими световыми рассеивающими наконечниками. Такие катетеры изготавливаются из гибких многомодовых волокон с диаметром сердцевины от 200 до 1000 мкм и имеют покрытие, не обладающее токсичностью. Недостатками существующих диффузоров является их

толщина и малые критические изгибы. Идеальные цилиндрические диффузные облучатели должны формировать гомогенный симметричный цилиндр света. Для некоторых применений необходимы тонкие, гибкие и прочные диффузоры, способные проникать в труднодоступные отверстия с диаметрами 100–300 мкм и сохранять свои эксплуатационные свойства [2, 3, 4].

Относительно мало исследований о влиянии лазерного излучения со сходными параметрами на жизнеспособность прокариотических и эукариотических клеток.

Цель исследования – установить оптимальную мощность светодиодного синего (405 нм), красного (650 нм) и зеленого (520 нм) излучения аппарата нового образца, позволяющего элиминировать прокариотические клетки и не повредить клетки человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве генератора излучения применяли диодный медицинский лазер ЛФДТ-02 нового образца Пермской научно-производственной приборостроительной компании. Облучение как бактериальных, так и клеток макроорганизма производилось с помощью волоконно-оптического зонда для фотодинамической терапии, который представляет собой отрез оптического волокна длиной 3–5 м, на конце которого сформирован диффузор. Диффузор изготовлен с помощью эффекта плавления сердцевины. В сердцевине диффузора сформированы структуры микропузырьков или микрокапилляр. Сформированные структуры выводят распространяющееся излучение из сердцевины в оболочку. Диффузор излучает с боковой поверхности от 25 до 100 % распространяющегося по волокну излучения.

Рассеивающийся профиль диффузора близок к цилиндрическому. Изменение рассеянной интенсивности такого диффузора по длине составляет менее 20 % [5].

Для исследования влияния лазерного излучения на прокариотические клетки был выбран клинический штамм *Staphylococcus aureus* ббЖ, который культивировали на желточно-солевом агаре. Инокулюм готовили по оптической мутности с помощью денситометра до значения 0,1. В дальнейшем содержимое пробирки разводили в 10 раз стерильным физиологическим раствором и делили на две порции (опыт и контроль). Содержимое опытной пробирки подвергалось облучению лазером с различной длиной волны (время экспозиции – 2 мин, мощность – 22 mV). Контрольную пробирку не подвергали лазерному излучению. Затем содержимое обеих пробирок засеивали на желточно-солевой агар в объеме 0,1 мл. После экспозиции проб при 37°C в течение 24 ч производили учет роста колоний.

Для изучения влияния лазерного излучения на клетки макроорганизма у 17 практически здоровых добровольцев в возрасте 20–25 лет с интактным пародонтом и зубным рядом, без соматической патологии на тощак получали образцы буккального эпителия [6] с помощью ватного тампона. Число клеток подсчитывали в камере Горяева. Для оценки жизнеспособности клеток использовали витальный краситель – 0,1 % раствор трипанового синего. Живые клетки трипановый синий практически не окрашивает, мертвые – однородно по всей клетке [7]. Подсчет жизнеспособных клеток проводили в пробах после действия лазерного излучения, а также в контрольных пробах, хранившихся в условиях темноты. Время экспози-

ции и мощность не отличаются от таковых для исследуемого штамма *S. aureus*. Для оценки морфологических изменений эпителиоцитов готовили препараты для микрофотографии, которые после фиксации окрашивали по методу Романовского – Гимзе [5].

Все исследования осуществляли в трех повторениях.

Для статистического анализа полученных данных использовали парный вариант *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведенного исследования установлено, что эффект от лазерного излучения оказывает бактериостатическое действие на клинический штамм *S. aureus*. Так, число колоний после облучения бактерий излучением красного цвета (650 нм) было $1,90 \pm 0,22$ lg КОЕ, а в контрольной пробе – $2,2 \pm 0,18$ lg КОЕ ($p < 0,05$). Аналогичный результат получен при воздействии на тест-штамм излучением синего цвета (405 нм) – $1,93 \pm 0,01$ и $2,25 \pm 0,04$ lg КОЕ соответственно ($p < 0,05$). После облучения лазером зеленого цвета (520 нм) – $2,26 \pm 0,05$ lg КОЕ, а в пробах, не подвергавшихся воздействию лазера, – $2,30 \pm 0,05$ lg КОЕ ($p < 0,05$). Можно предположить, что это обусловлено нагревающим эффектом лазера, который создается в зоне воздействия излучения. Кроме этого известно, что при использовании лазерного излучения могут формироваться свободные радикалы, способные разрушать компоненты клеточной стенки [2, 3].

В серии экспериментов с эукариотическими клетками показано, что за 2 мин воздействия красного излучения количество жизнеспособных клеток буккального эпителия уменьшается до $35,9 \pm 1,5$ %. Для синего цвета

данный показатель был равен $41,5 \pm 1,3$ %. После облучения эпителиальных клеток излучением зеленого цвета их количество снижается до $40,3 \pm 1,6$ % (в контрольных пробах – $71,3 \pm 0,9$ %; $p < 0,05$).

В целом при оценке действия лазерного излучения, особенно в клинических условиях, необходимо учитывать его возможное влияние не только на клетки условно-патогенных микроорганизмов, но и на клетки человека. В настоящем исследовании показано, что лазерное излучение мощностью 22 mV позволяет достичь бактериостатического действия, но при этом существенно снижается жизнеспособность и букальных эпителиоцитов, что можно рассматривать, с одной стороны, как побочное действие лазерного излучения, а с другой стороны, удаление отмирающих клеток, наполненных микроорганизмами, может усилить эффект проводимой терапии.

Выводы

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что наиболее выраженным бактериостатическим действием обладает лазерное излучение диодного лазера с длиной волны 405 (синий) и 650 (красный) нм. Излучение с длиной волны 520 нм (зеленый) не оказывает столь выраженного эффекта. Однако было установлено существенное поражающее действие излучения красного цвета на клетки макроорганизма.

Библиографический список

1. Фиалкина С.В., Алексеев Ю.В., Коновалова Г.Н., Луковкин А.В., Бондаренко В.М. Подавление жизнеспособности клеток стафилококков лазерным лучом 1270 нм. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2012; 5: 70–73.
2. Кокая А.А., Ведунова М.В., Митрошина Е.В., Козяков В.П., Мухина И.В. Влияние электромагнитного излучения на жизнеспособность гепатоцитов при токсическом действии гидразинов. Вестник Российской военно-медицинской академии 2013; 1(41): 136–142.
3. Конаев С.Ю., Конаева В.Г., Сабурова И.Н., Борзенко С.А. Влияние излучения гелий-неонового лазера на состояние клеток лимбальной зоны глаза человека. Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание 2015; 1: 2–16.
4. Хохлова А.В., Золотовский И.О., Погодина Е.С., Саенко Ю.В., Столяров Д.А., Ворсина С.Н., Соколовский С.Г., Фотиади А.А., Лямина Д.А., Рафаилов Э.У. Воздействие лазерного излучения с длиной волны 1265 нм на культуру клеток аденокарциномы человека. Наноиндустрия 2019; 12(2): 86–95.
5. Кошин Ю.А., Быкова Л.П., Яковлев М.В., Батог К.А., Годовалов А.П., Ременникова М.В. Особенности воздействия лазерного диодного излучения с длиной волны 650 нм на эпителиальные клетки человека. Материалы Международной научно-технической конференции с элементами научной молодежной школы, посвященной 20-летию ведущей научной школы России «Волоконно-оптическое приборостроение». Пенза 2018; 126–127.
6. Мельник К.Н., Башиева Г.М., Гильмиярова Ф.Н., Аллатова Т.А. Саливадиагностика как метод определения иммунологической адаптации к учебному стрессу в условиях различного питьевого поведения. Клиническая лабораторная диагностика 2018; 63(6): 353–357.
7. Louis K.S., Siegel A.C. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. Methods Mol Biol 2011; 740: 7–11.

REFERENCES

1. *Fialkina S.V., Alekseev Ju.V., Konovalova G.N., Lukovkin A.V., Bondarenko V.M.* Suppression of viability of staph cells by a laser beam of 1270 nm. *Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii* 2012; 5: 70–73 (In Russian).
2. *Kokaja A.A., Vedunova M.V., Mitrosbina E.V., Kozjakov V.P., Mubina I.V.* The effect of electromagnetic radiation on the viability of hepatocytes in the toxic effect of hydrazines. *Vestnik Rossijskoj voenno-meditsinskoj akademii* 2013; 1(41): 136–142 (In Russian).
3. *Kopaev S.Ju., Kopaeva V.G., Saburina I.N., Borzenok S.A.* The effect of helium-neon laser radiation on the state of the cells of the limbal zone of the human eye. *Vestnik novyh medicinskih tehnologij. Jelektronnoe izdanie* 2015; 1: 2–16 (In Russian).
4. *Hoblova A.V., Zolotovskij I.O., Pogodina E.S., Saenko Ju.V., Stoljarov D.A., Vorsina S.N., Sokolovskij S.G., Fotiadi A.A., Ljamina D.A., Rafailov Je.U.* The impact of laser radiation with a wavelength of 1265 nm on the cell culture of human adenocarcinoma. *Nanoindustrija* 2019; 12(2): 86–95 (In Russian).
5. *Konin Ju.A., Bykova L.P., Jakovlev M.V., Batog K.A., Godovalov A.P., Remennikova M.V.* Features of the effects of laser diode radiation with a wavelength of 650 nm on human epithelial cells. *Materialy Mezhdunarodnoj nauchno-tehnicheskoy konferencii s jelementami nauchnoj molodezhnoj shkoly, posvjashhennoj 20-letiju vedushhej nauchnoj shkoly Rossii "Volokonno-opticheskoe priborostroenie"*. Penza 2018; 126–127 (In Russian).
6. *Mel'nik K.N., Baisheva G.M., Gil'mijarova F.N., Allatova T.A.* Salivadiagnosis as a method for determining the immunological adaptation to educational stress in conditions of various drinking behavior. *Klinicheskaja laboratornaja diagnostika* 2018; 63(6): 353–357 (In Russian).
7. *Louis K.S., Siegel A.C.* Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods Mol Biol* 2011; 740: 7–11.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Материал поступил в редакцию 25.01.2020