

ВИЗНАЧЕННЯ ПРОТИВІРУСНОЇ ДІЇ ЛАЗЕРНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА МОДЕЛІ ЧУТЛИВИХ КЛІТИН ТА ВІРУСУ ГРИПУ

Березіна Л.В., Фільчаков І.Г., Міроненко А.П.,
*Войцехович В.С., **Холін В.В., Радченко Л.В.

ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В.Громашевського НАМН України»,
03038 Україна, м. Київ, вул. М.Амосова, 5; тел.: +38 (050) 442-44-98, 420-92-44;
e-mail: berezka1970@ukr.net, +38 (067), filchakovigor@gmail.com;

*Інститут фізики НАН України,

03028 Україна, м. Київ, просп. Науки, 46; тел.: +38 (096) 086-27-72, e-mail: val555@mail.ru;

**ПМВП «Фотоніка Плюс»,

18023 Україна, м. Черкаси, вул. Одеська, 8, корп. 44,
тел.: +38 (067) 470-15-60, e-mail: info@fotonikaplus.com.ua

Вивчено in vitro можливу противірусну дію лазерного випромінювання з різною довжиною хвилі у неперервному та імпульсному (з модуляцією випромінювання на частоті 0,1-99 Гц зі скважністю 0,5; з частотою 76 МГц та фемтосекундною тривалістю імпульсів) режимах роботи лазера на моделі чутливих клітин MDCK та вірусів грипу. Отримані результати довели відсутність противірусної дії світла з довжиною хвилі 370, 405, 532 і 635 нм in vitro при використаних щільностях потужності (5-50 мВт/см²) та експозиціях (10 і 20 хв.). Встановлено також, що лазерне опромінення за вказаними протоколами не призводить до руйнування моношару та загибелі клітин MDCK.

Ключові слова: низькоінтенсивне лазерне опромінення, вірус грипу, цитопатогенна дія.

Вступ

Широке використання низькоінтенсивного лазерного випромінювання при лікуванні різних захворювань в клінічній практиці свідчить про те, що воно призводить до індукції в організмі людини функціональних змін, які проявляються позитивним впливом на стан пацієнта. Механізми цього впливу, однак, дотепер залишаються нез'ясованими [1]. Зокрема це стосується методів лазерної терапії хворих з вірусними інфекціями, особливо – використання екстракорпорального лазерного опромінення крові в лікуванні хворих на ураження нервової системи вірусної етіології [2, 4]. Одним із можливих механізмів лікувальної дії є порушення цілісності ліпідної оболонки вірусів фотонами світла, що перешкоджає реалізації життєвого циклу збудників та призводить до їх загибелі [5].

Характер взаємодії світла із біологічною тканиною залежить від параметрів лазерного випромінювання та властивостей самого об'єкта опромінення. На теперішній час розроблена концепція прямої дії низькоінтенсивного лазерного

випромінювання на біологічні об'єкти внаслідок резонансного поглинання світла на молекулярному рівні [8]. У біологічних об'єктах наявні фоточутливі акцептори, які поглинають випромінювання з різними довжинами хвиль. Встановлено, що фотобіологічну активність має світло в ультрафіолетовій, видимій та ближній інфрачервоній ділянках спектру.

Метою даного дослідження було вивчити in vitro можливу пряму противірусну дію низькоінтенсивного лазерного випромінювання з різною довжиною хвилі на моделі чутливих клітин та вірусу грипу.

Матеріали та методи

В дослідженнях використовували лазерне випромінювання у неперервному режимі (НР) або імпульсному режимі (ІР). В якості його джерел були застосовані:

1) лазерний комплекс виробництва ТОВ «Біофізика-Україна» (ТУ У 33,1-34413533-001.2008; свідоцтво про державну реєстрацію № 8445/2008, від 24.12.2008 р.), розроблений на

базі фемтосекундного (ФС) лазера Mira Optima 900-F (Coherent) з змінною довжиною хвилі випромінювання (350-450 нм), частотою імпульсів 76 Мгц та їх фемтосекундною (ФС) тривалістю; використана середня щільність потужності опромінення від 5 до 20 мВт/см²;

2) лазер «Ліка-терапевт» з довжиною хвилі випромінювання 405 нм або 635 нм у неперервному або імпульсному режимі (модуляція з частотою 0,1-99 Гц та скважністю 0,5) опромінення; середня щільність потужності 25–50 мВт/см²;

3) лазер Laser Pointer LG 009 (модернізований, з живленням від зовнішнього стабілізованого блоку) неперервної дії з довжиною хвилі випромінювання 532 нм та щільністю потужності 5–10 мВт/см².

Можливу противірусну дію лазерного опромінення вивчали *in vitro* на моделі чутливих клітин та вірусу грипу А (H3N2). В досліджах використовували культуру клітин MDCK та культуральне середовище DMEM з додаванням ембріональної телячої сироватки, глютаміну та антибіотиків (пеніцилін/стрептоміцин). Накопичення вірусів проводили на культурі клітин MDCK для одержання культуральної рідини, яка б містила віруси грипу у титрах 1:32 і вище (в реакції гемаглютинації). Вірус грипу вносили в пробірки з моношаром клітин MDCK та витримували в термостаті 2

дублювали двома пробірками. В якості контролю були взяті неопромінені клітини та неопромінені клітини з вірусом грипу.

Оцінку результатів цитопатогенної дії (ЦПД) вірусу грипу на культурі клітин MDCK проводили візуально на протязі 24-72 годин за методом «++++» [3, 7], де:

+ - моношар культури клітин MDCK не пошкоджений дією вірусів, але спостерігається поява набухлих та збільшених за розмірами клітин;
++ - поява перших ознак пошкодження моношару («дірок»);

+++ - збільшення кількості «дірок» та їх розмірів;

++++ - майже повне руйнування моношару клітин, присутність окремих острівців клітин.

Результати та їх обговорення

Результати дослідів, які представлені у табл. 1, свідчать про те, що лазерне опромінення клітин MDCK червоним світлом за 2 години після внесення вірусів грипу не забезпечувало захисту чутливих клітин від ЦПД вірусів. Такі дані були отримані при використанні протоколів лазерного опромінення, що значно відрізнялись один від одного. Це може свідчити про відсутність дії фотонів червоного світла на реплікацію та інші етапи життя вірусів грипу.

Таблиця 1

Вплив різних протоколів опромінення з довжиною хвилі 635 нм на ЦПД вірусів грипу в культурі клітин MDCK

Досліджені проби	ЦПД вірусів грипу на культуру клітин MDCK					
	Неопромінені проби	Протоколи опромінення				
		НР, 5 мВт/см ² , 10 хв.	НР, 5 мВт/см ² , 20 хв.	НР, 10 мВт/см ² , 10 хв.	ІР 40 Гц, 50 мВт/см ² , 10 хв.	ІР 90 Гц, 50 мВт/см ² , 10 хв.
Культура клітин MDCK	–	–	–	–	–	–
Культура клітин MDCK + вірус грипу	++++	++++	++++	+++	+++	+++

Примітка: тут та в табл. 2, 3, 4 та 5 – відсутність ЦПД; + наявність ЦПД.

години при 34°C, після чого пробірки опромінювали лазерним світлом.

У досліджах для перевірки його можливої противірусної дії було використано лазерне випромінювання у НР або ІР з різною довжиною хвилі (635, 532, 405 та 370 нм) при експозиціях опромінення 5, 10, 15, 20 хв. та середніх щільностях потужності 5, 10, 15, 30, 50 мВт/см². Після опромінення пробірки тримали в умовах термостату при 34°C. Для кожного з режимів опромінення проби

Такі ж результати були одержані при використанні фіолетового лазерного випромінювання. Як свідчать дані, наведені в табл. 2, жодний з протоколів неперервного опромінення не захищав чутливі клітини від ЦПД вірусу грипу. Не заважало останній і застосування більш високих, ніж у попередньому випадку, рівнів щільності потужності неперервного випромінювання (30 та 50 мВт/см²).

З даних, наведених у таблиці 3, випливає, що використання різних ІР фіолетового лазерно-

Таблиця 2

Вплив різних протоколів опромінення з довжиною хвилі 405 нм у НР на ЦПД вірусів грипу в культурі клітин MDCK

Досліджені проби	ЦПД вірусів грипу на культуру клітин MDCK					
	Неопро-мінені проби	Протоколи опромінення				
		5 мВт/см ² , 10 хв.	5 мВт/см ² , 20 хв.	10 мВт/см ² , 10 хв.	30 мВт/см ² , 20 хв.	50 мВт/см ² , 20 хв.
Культура клітин MDCK	–	–	–	–	–	–
Культура клітин MDCK + вірус грипу	++++	++++	+++	+++	+++	+++

го світла для опромінення інфікованої культури клітин MDCK також не відміняло ЦПД вірусів грипу. Такий ефект відмічався при використанні різних середніх щільностей потужності та експозицій опромінення.

В дослідженнях на моделі чутливих клітин та вірусів грипу нами була перевірена й зелена ділянка світлового спектру. Дані, наведені в табл. 4,

спектру) при ІР ФС опроміненні, який спостерігався по відношенню до деяких грамнегативних і грампозитивних бактерій [6]. Наприклад, лазерне опромінення з такими параметрами впродовж 10 хв. призводило до руйнації структури біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* [6].

Тому цей протокол опромінення також був впробуваний нами на моделі чутливих клітин та

Таблиця 3

Вплив різних протоколів лазерного опромінення з довжиною хвилі 405 нм в ІР на ЦПД вірусів грипу в культурі клітин MDCK

Досліджені проби	ЦПД вірусів грипу на культуру клітин MDCK					
	Неопро-мінені проби	Протоколи опромінення				
		ІР 40 Гц, 50 мВт/см ² , 10 хв.	ІР 90 Гц, 50 мВт/см ² , 10 хв.	ІР ФС, 5 мВт/см ² , 10 хв.	ІР ФС, 10 мВт/см ² , 10 хв.	ІР ФС, 15 мВт/см ² , 5 хв.
Культура клітин MDCK	–	–	–	–	–	–
Культура клітин MDCK + вірус грипу	++++	+++	+++	++++	+++	+++

свідчать про те, що лазерне опромінення зеленим світлом інфікованих клітин MDCK у НР, як і в інших випадках, не забезпечувало захист чутливих клітин від ЦПД вірусів.

Раніше нами були отримані дані про виражений бактерицидний ефект дії фотонів світла з довжиною хвилі 370 нм (ультрафіолетова частина

вірусів грипу. Як свідчать дані, наведені в табл. 5, ультрафіолетове опромінення інфікованих клітин MDCK у ІР ФС за протоколами, що були застосовані, не захищало ці клітини від ЦПД вірусів.

На наш погляд, наведені дані свідчать про відсутність противірусної дії *in vitro* світла з до-

Таблиця 4

Вплив лазерного опромінення з довжиною хвилі 532 нм у НР на ЦПД вірусів грипу в культурі клітин MDCK

Досліджені проби	ЦПД вірусів грипу на культуру клітин MDCK			
	Неопромінені проби	Протоколи опромінення		
		10 мВт/см ² , 5 хв.	10 мВт/см ² , 10 хв.	10 мВт/см ² , 20 хв.
Культура клітин MDCK	–	–	–	–
Культура клітин MDCK + вірус грипу	++++	++++	+++	++++

**Вплив різних протоколів опромінення з довжиною хвилі 370 нм у ІР ФС
на ЦПД вірусів грипу в культурі клітин MDCK**

Досліджені проби	ЦПД вірусів грипу на культуру клітин MDCK			
	Неопромінені проби	Протоколи опромінення		
		5 мВт/см ² , 10 хв.	10 мВт/см ² , 10 хв.	15 мВт/см ² , 5 хв.
Культура клітин MDCK	–	–	–	–
Культура клітин MDCK + вірус грипу	++++	+++	+++	+++

вжиною хвилі 370, 405, 532 і 635 нм при використаних режимах потужностей та експозицій лазерного опромінення. Слід також зазначити, що в жодному випадку лазерне опромінення за вказаними протоколами само по собі не призводило до руйнування моношару та загибелі клітин MDCK.

Перспективи продовження досліджень полягають в подальшому пошуку можливих протівірусних ефектів лазерного випромінювання на інших експериментальних моделях *in vitro* та *in vivo*.

Висновки

1. Доведена відсутність прямої протівірусної дії *in vitro* лазерного опромінювання з довжиною хвилі 370, 405, 532 і 635 нм у неперервному та імпульсному режимах при експозиціях опромінення 5, 10, 15, 20 хв. та середніх щільностях потужності 5, 10, 15, 30, 50 мВт/см².

2. Встановлено, що лазерне опромінення за цими протоколами не призводить до руйнування моношару та загибелі клітин MDCK.

Література

1. Беликов А.В. Лазерные биомедицинские технологии: учебное пособие. Ч.2 / А.В.Беликов, А.В.Скрипник.– СПб.: СПбГУ ИТМО, 2009.– 100 с.
2. Березина Л. В. Використання фотонних технологій у терапії уражень центральної нервової системи при герпесвірусних інфекціях / Л.В.Березина, В.І.Матяш, О.Л.Панасюк, І.В.Фільчаков // Природно-осередкові інфекції: Тези доповідей Всеукраїнської науково-практичної конференції інфекціоністів (17-18 травня 2012 р.)– Ужгород, 2012.– С.127–129.
3. Глозов Н.В. Биометрия / Н.В.Глозов, Л.А.Животовский, И.Н.Хромов; под ред. М.М.Тихомировой.– Л.: Издательство Ленинградского университета, 1982.– 264 с.
4. Макашова В.В. Сравнительная оценка эффективности различных способов применения лазеротерапии у больных острым вирусным гепатитом В // Терапевтический архив.– 2001.– №11.– С.26–30.
5. Пантьо В.В. Вплив низькоінтенсивного лазерного випромінювання на біологічні об'єкти та чутливість мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів / В.В.Пантьо, В.І.Николайчук, В.І.Пантьо, А.В.Корунець // Фотобіологія і фотомедицина.– 2010.– №1,2.– С.80–87.
6. Покас О.В. Вплив лазерного опромінення на структуру біоплівки *Pseudomonas Aeruginosa* / О.В.Покас, О.І.Поліщук, В.О.Каневський, І.В.Фільчаков // Профілактична медицина.– 2012.– №2.– С.36–40.
7. Про заходи щодо профілактики і боротьби з пташиним грипом та запобігання виникненню його пандемії / Нормативний документ МОЗ України. Наказ № 488 від 17.07.2006 р. Офіц. вид.- Київ: МОЗ України, 2006.- 18 с.
8. Karu T.I. Photobiology of low-power laser therapy.– London: Harwood, Acad. Publ., 1989.- 268 с.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОГО ДЕЙСТВИЯ ЛАЗЕРНОГО ОБЛУЧЕНИЯ
НА МОДЕЛИ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК И ВИРУСА ГРИППА**

Березина Л.В., Фильчаков И.В., Мироненко А.П., Войцехович В.С., Холин В.В., Радченко Л.В.
Тел.: +38 (067) 470-15-60, e-mail: info@fotonikaplus.com.ua

Изучено in vitro возможное противовирусное действие лазерного излучения с различной длиной волны в непрерывном и импульсном (с модуляцией излучения на частоте 0,1-99 Гц с скважностью 0,5; с частотой 76 МГц и фемтосекундной длительностью импульсов) режимах работы лазера на модели чувствительных клеток MDCK и вирусов гриппа в системе. Полученные результаты доказали отсутствие противовирусного действия света с длиной волны 370, 405, 532 и 635 нм in vitro при использованных плотностях мощности (5-50 мВт/см²) и экспозициях (10 и 20 мин.). Также установлено, что лазерное облучение по указанным протоколам не приводило к разрушению монослоя и гибели клеток MDCK.

Ключевые слова: низкоинтенсивное лазерное облучение, цитопатогенное действие, вирус гриппа.

**DETERMINATION OF ANTIVIRAL ACTIVITY OF LASER IRRADIATION
ON A MODEL OF SENSORY CELLS AND INFLUENZA VIRUS**

Berezina L., Filchakov I., Mironenko A., Voitsekhovich V., Holin V., Radchenko L.
Tel.: +38 (067) 470-15-60, e-mail: info@fotonikaplus.com.ua

In experiments in vitro the possible antiviral effect of laser radiation with different wavelengths in continuous and impulse (with modulation frequency radiation 0,1-99 Hz and duty cycle of 0,5; with and a frequency of 76 MHz and pulse duration of a femtosecond) laser modes on the model of sensitive MDCK cells and influenza viruses are studied. The results obtained showed no antiviral action of light with wavelengths of 370, 405, 532 and 635 nm in vitro for laser irradiation with power densities of 5-50 mW/cm² and exposures of 10 and 20 min.. Also found that the laser radiation in the specified protocol did not lead to the destruction of the monolayer and cell death MDCK.

Keywords: low-intensity laser irradiation, tsytopatohenna action, the influenza virus.