

АНТИБАКТЕРІАЛЬНА АКТИВНІСТЬ СВІТЛОВИХ ПРОМЕНІВ І ФОТОСЕНСИБІЛІЗАТОРІВ

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія»

Одним із етіологічних чинників розвитку хронічного періодонтиту є дія мікробного фактора. Прогноз ендодонтичного лікування хронічних верхівкових періодонтитів певною мірою залежить від якісної медико-інструментальної обробки кореневих каналів [1, 2, 3].

В інфікованих корневих каналах знаходиться велика кількість мікроорганізмів, які здатні проникати як у мікрівідгалуження, так і дентинні каналці кореня зуба [4, 5].

Останніми роками в медичній практиці використовується фотоактивована терапія за допомогою лазерного випромінювання, метою якої є знезараження інфікованих тканин, протизапальний та імунокорегуючий вплив на патологічне вогнище організму [6, 7, 8].

Проте даних про вплив некогерентного випромінювання апарата «UFL-122» фірми «Люкс Дент» та фотосенсибілізуючих речовин на чутливість мікроорганізмів у літературі ми не зустріли.

Метою нашого дослідження стало вивчення чутливості мікроорганізмів до дії фотосенсибілізуючих речовин, світлових променів різних ділянок видимого спектра та їхньої поєднаної дії в досліді *in vitro* для оцінки перспективності використання їх у медико-інструментальній обробці корневих каналів при лікуванні хронічного верхівкового періодонтиту.

Матеріали та методи дослідження

Мікробіологічні дослідження проводили в сертифікованій мікробіологічній лабораторії 3-ї міської лікарні м. Полтави.

Дослідження проводили відповідно до наказу МОЗ СРСР за № 535 від 22 квітня 1985 р. «Про уніфікацію мікробіологічних (бактеріологічних) методів до-

слідження, що застосовуються в клініко-діагностичних лабораторіях лікувально-профілактичних закладів» [9].

Матеріалом для мікробіологічного дослідження слугували путридні маси, які отримували з корневих каналів зубів хворих на гранулюючий та на гранулематозний хронічний верхівковий періодонтит. Щоб запобігти контамінації матеріалу мікрофлорою навколишнього середовища, матеріал із корневих каналів забирали за дотримання відповідних правил асептики. Зуб і каріозну порожнину попередньо обробляли 70° спиртом. Після розкриття порожнини зуба проводили поетапну евакуацію путридних мас із кореневого каналу.

Путридні маси для бактеріологічного дослідження забирали після розкриття верхівкового отвору з нижньої третини кореневого каналу за допомогою стерильного адсорбційного паперового штифта (ISO №20). У пробірку з транспортним середовищем – 1 мл 0, 9% NaCl (фізіологічного розчину) занурювали відрізок штифта довжиною 15 мм. Матеріал направляли в бактеріологічну лабораторію протягом 2 год. від моменту забору.

Для виділення мікроорганізмів у чистих культурах та їх ідентифікації було використано ряд живильних середовищ: 5% кров'яний агар, середовище Ендо, середовище Сабуро, жовтково-сольовий агар. Чисті культури мікроорганізмів, виділені від хворих (*S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *C. albicans*), а також музейний штам *E. coli* було використано для проведення подальших досліджень антимікробної активності лікарських розчинів та світлових променів.

Культивування бактерій проводили на живильному агарі та

цукровому живильному агарі. З чистих культур мікроорганізмів робили завись мікробних тіл (10^8) у фізіологічному розчині за стандартом мутності. Для цього було використано Галузевий стандарт мутності, виготовлений Державним науково-дослідним інститутом стандартизації і контролю медичних біологічних препаратів ім. Л. О. Тарасевича.

Для визначення антимікробної дії хімічних речовин використовували модифіковану методику Креджі та Іенсена. В основу методики покладене вирощування досліджуваної культури на середовищах, що містять відповідні хімічні розчини [10]. Це відповідає наказу № 167 МОЗ України від 05. 04. 2007 р. про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів».

У ролі фотосенсибілізаторів використовували 1% спиртовий розчин хлорофіліпту, 0, 1% водний розчин риванолу та 2% водний розчин метиленового синього.

У ролі джерела випромінювання використовували багатофункціональний апарат «UFL-122» фірми «Люкс Дент» із системою інтерференційних фільтрів, які пропускають діапазони видимої ділянки спектра. Опромінення здійснювали за допомогою фокона, при цьому інтенсивність червоного світла складала 8, 2МВ т/см² із довжиною хвилі 545-640 нм і максимумом 602 нм, зелене – 2, 5МВ т/см² із довжиною хвилі 538-583 нм і максимумом 567 нм, синє – 2, 04МВ т/см² із довжиною хвилі 360-530 нм і максимумом 487 нм.

Чутливість мікроорганізмів до фотосенсибілізуючих речовин визначали таким чином: на чашки з культурами, посіяними газоном, фотосенсибілізатори наносили

Чутливість культур мікроорганізмів, виділених із корневих каналів хворих на хронічний верхівковий періодонтит і музейного штаму *E. coli*, до лікарських речовин у досліді *in vitro*

№	Тест культури	Розчини		
		2% водний розчин метиленового синього (n=6)	0, 1% водний розчин риванолу (n=6)	1% спиртовий розчин хлорофіліпту (n=6)
		Діаметр зон затримки росту (мм)		
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	8,1±0,57	нечутливий	10,4±0,46**
2	<i>Streptococcus pyogenes</i>	12,4±0,49	нечутливий	10,2±0,31**
3	<i>Enterococcus faecalis</i>	22,2±0,44	нечутливий	10,3±0,66***
4	<i>Escherichia coli</i>	14,5±0,45	нечутливий	нечутливий
5	<i>Candida albicans</i>	8,4±0,21	10,5±0,41**	нечутливий

* -p<0, 05- у порівнянні з 2% водним розчином метиленового синього;

** -p<0, 01-у порівнянні з 2% водним розчином метиленового синього;

*** -p<0, 001-у порівнянні з 2% водним розчином метиленового синього.

краплями (одна крапля – 0, 01 мл). Вплив досліджуваних речовин оцінювали за розміром зони відсутності росту мікроорганізмів. Розмір зони відсутності росту вимірювали міліметровою лінійкою. Відсутність зони затримки росту розцінювали як відсутність антимікробної дії речовини, діаметр зони до 9 мм – як свідчення слабкої антимікробної дії, від 10 до 19 мм – середньої, від 20 мм і більше – як сильної.

Визначали антимікробний вплив світлових променів червоної, зеленої, синьої частин спектра. Для проведення цього дослідження 1 мл стандартної зависі мікроорганізмів наливали в пластмасові контейнери (5, 5 см довжиною та 0, 6 мм шириною). Безпосередньо до контейнера підводили світловод апарата «UFL-122» фірми “Люкс Дент” і опромінювали червоною або зеленою чи синьою ділянками спектра протягом 3 хв. за методикою, описаною нами раніше [11]. Потім увесь об’єм зависі кількісно переносили в стерильні чашки Петрі, додавали 10 мл розплавленого та охолодженого живильного середовища, вміст чашок перемішували шляхом похитування. Чашки ставили в термостат і інкубували протягом 24 год. при температурі 37°C. Після цього підраховували кількість колонісуючих одиниць (КУО). Вплив світла на мікро-

організми оцінювали за зміною кількості КУО в 1 мл досліджуваної зависі культури.

Синергічну антимікробну активність лікарських речовин та світлових променів визначали так: попередньо опромінену методом, описаним вище, суспензію мікроорганізмів засівали на поживні середовища газомом. Наносили по 0, 01 мл відповідних хімічних розчинів на чашки і ставили в термостат. Інкубували 24 год. при температурі 37°C. Після цього вимірювали діаметр зон затримки росту, які виникали за спільної дії світла і фотосенсibiliзуючих речовин. Результати оцінювали аналогічно описаному методу для визначення антимікробної активності розчинів хімічних речовин.

Отримані в результаті дослідження дані підлягали варіаційному статистичному аналізу з використанням непараметричного критерію Манна-Уїтні. Відмінності вважали достовірними при p<0, 05.

Результати дослідження та їх обговорення

Результати визначення чутливості чистих культур мікроорганізмів, виділених з умісту корневих каналів за умов хронічних верхівкових періодонтитів, а також музейного штаму *E. coli*, до лікарських речовин у досліді *in vitro* представлено в табл. 1.

За даними табл. 1, усі досліджувані штами мікроорганізмів виявилися чутливими до розчину метиленового синього у 2% концентрації. *S. aureus* та *C. albicans* були низькочутливими до цього розчину. *S. pyogenes* та *E. coli* були помірно чутливими до дії цього розчину. Виявлено високу чутливість *E. faecalis* до 2% водного розчину метиленового синього. Діаметр зони відсутності його росту становив 22, 2±0, 44 мм.

Водний розчин риванолу в концентрації 0, 1% у наших дослідах не проявляв антибактеріальної активності. Гриби роду *C. albicans* були помірно чутливими до дії цієї речовини, і діаметр зони відсутності росту становив 10, 5±0, 41 мм.

1% спиртовий розчин хлорофіліпту не здійснював антимікробної дії на кишкову паличку та гриби роду *C. albicans* (зони затримки росту були відсутні). Статистична обробка матеріалу свідчить про достовірну чутливість до *S. aureus* 1% спиртового розчину хлорофіліпту в порівнянні з 2% водним розчином метиленового синього в 1, 2 рази (p<0, 01). І навпаки, про достовірну різницю чутливості *S. pyogenes* (p<0, 01) і *E. faecalis* (p<0, 001) до 2% водного розчину метиленового синього в порівнянні з 1% спиртовим розчином хлорофіліпту.

Вплив світлового випромінювання на культури мікроорганізмів, виділені з корневих каналів хворих на хронічний верхівковий періодонтит та музейного штаму *E. coli*, у досліді *in vitro*

№	Тест культури	Початкова концентрація м/о в 1 см ³ зависі	Кількість мікроорганізмів у 1см ³ зависі		
			Спектри випромінювання		
			червоний (n=6)	зелений (n=6)	синій (n=6)
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	108	102 $p_1 < 0,001$	106 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	105 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,001$
2	<i>Streptococcus pyogenes</i>	108	104 $p_1 < 0,001$	104 $p_1 < 0,001$	104 $p_1 < 0,001$
3	<i>Enterococcus faecalis</i>	108	104 $p_1 < 0,001$	105 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	104 $p_1 < 0,001$ $p_3 < 0,001$
4	<i>Escherichia coli</i>	108	104 $p_1 < 0,001$	104 $p_1 < 0,001$	104 $p_1 < 0,001$
5	<i>Candida albicans</i>	108	104 $p_1 < 0,001$	104 $p_1 < 0,001$	104 $p_1 < 0,001$

p_1 – у порівнянні з початковою концентрацією зависі;
 p_2 – у порівнянні з опроміненням червоним світлом;
 p_3 – у порівнянні з опроміненням зеленим світлом.

Дані щодо впливу світлового випромінювання на культури, які виділені з корневих каналів хворих на хронічний верхівковий періодонтит, та музейний штам *E. coli* у досліді *in vitro* представлені в табл. 2.

Нами виявлено антимікробну дію світлового випромінювання всіх досліджуваних ділянок спектра.

Червона ділянка спектра випромінювання виявилася найбільш ефективною відносно *S. aureus*. Кількість КУО в цьому випадку зменшувалась у 4 рази і становила 10^2 КУО після опромінення в порівнянні з початковою концентрацією мікроорганізмів у 1 см³ зависі до впливу світла ($p < 0,001$). Червоні промені проявляли також антибактеріальну активність до *E. faecalis*, *C. albicans*, *S. pyogenes* та *E. coli*, проте вона була дещо нижчою при статистично вірогідній різниці ($p < 0,001$).

Найменш чутливими до мікроорганізмів виявився вплив променів зеленої ділянки спектра. Так, кількість КУО *S. aureus* та *E. faecalis* після опромінення зменшувалась у 1, 3-1, 6 рази. А *S. pyogenes*, *C. albicans*, *E. coli* зменшились у 2 рази після опромінення зеленим світлом і становили 10^4 КУО проти 10^8 КУО до опромінення ($p < 0,001$).

Опромінення культур мікроорганізмів променями синьої ділян-

ки спектра показувало схожі результати. До *S. aureus* сині промені виявилися найменш чутливими (кількість КУО дорівнювала – 10^5). Інші культури – *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *C. albicans*, *E. coli* були більш чутливими до дії синіх променів і КУО становили 10^4 бактерій у 1 см³ зависі в порівнянні з 10^8 КУО до опромінення ($p < 0,001$).

У зв'язку з тим, що найвищу антибактеріальну активність до вивчених штамів мікроорганізмів проявляли червоні промені, в наступній серії ми порівнювали поєднану чутливість мікроорганізмів до 2% водного розчину метиленового синього та червоного світла (табл. 3).

Так, за результатами табл. 3 видно, що поєднане застосування 2% водного розчину метиленового синього та червоного світла проявляло середню та високу антибактеріальну активність.

Статистична обробка отриманих даних свідчить про антибактеріальну активність як 2% водного розчину метиленового синього, так і червоного світла, що випромінює апарат «UFL-122» фірми "Люкс Дент". Висока антибактеріальна дія проявлялась за поєднаного застосуванні фотосенсибілізатора з червоним світлом відносно *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *E. coli*. Середня антибактеріальна активність була

виявлена нами до *S. aureus* та *C. albicans*.

Отже, антимікробна активність фотосенсибілізуючих речовин коливалась у межах від повної відсутності до середньої і навіть високої (у випадку дії 2% водного розчину метиленового синього на *E. faecalis*). Антимікробна активність 0, 1% водного розчину риванолу в наших дослідях не була виявлена, крім впливу на гриби *C. albicans*. 1% спиртовий розчин хлорофіліпту мав помірну чутливість на культури *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. faecalis*.

Опромінення викликало зменшення кількості КУО у всіх трьох ділянках спектра (червоній, зеленій та синій). Найефективнішими виявилися промені червоної ділянки спектра відносно *S. aureus*, коли після опромінення знижувалася концентрація мікроорганізмів у 4 рази. У всіх інших випадках концентрація бактерій знижувалася до 2 разів.

Найвищу антимікробну активність спостерігали за поєднаного застосування 2% розчину метиленового синього з червоною ділянкою спектра, що випромінює апарат «UFL-122» фірми "Люкс Дент". Це є підставою до їх застосування в ендодонтичній практиці для лікування хронічного верхівкового періодонтиту.

Чутливість культур мікроорганізмів, виділених із корневих каналів хворих на хронічний верхівковий періодонтит і музейного штаму *E. coli*, до 2% водного розчину метиленового синього та червоного світла в досліді *in vitro*

	Тест культури	Розчини	
		2% водний розчин метиленового синього (n=6)	поєднане застосування 2% водного розчину метиленового синього та червоного світла (n=6)
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	8,1±0,57	15,4±0,48***
2	<i>Streptococcus pyogenes</i>	12,4±0,49	23,0±0,32***
3	<i>Enterococcus faecalis</i>	22,2±0,44	23,1±0,62
4	<i>Escherichia coli</i>	14,5±0,45	21,1±0,19***
5	<i>Candida albicans</i>	8,4±0,21	15,6±0,89***

* -p<0, 05- у порівнянні з 2% водним розчином метиленового синього;

** -p<0, 01-у порівнянні з 2% водним розчином метиленового синього;

*** -p<0, 001-у порівнянні з 2% водним розчином метиленового синього.

Висновки

1. При визначенні чутливості культур до лікарських речовин у досліді *in vitro* найефективнішим виявився 2% водний розчин метиленового синього.

2. Дослідження впливу випромінювання на культури мікроорганізмів та грибів *C. albicans in vitro* виявило найвищу антимікробну активність променів червоної ділянки спектра, дещо нижчу активність синьої ділянки спектра. Найнижчою була активність зелених променів спектра.

3. При вивченні поєданого впливу лікарських речовин та некогерентного випромінювання апарата «UFL-122» фірми «Люкс Дент» на культури мікроорганізмів *in vitro* виявлено найпотужнішу антимікробну дію 2% водного розчину метиленового синього в поєднанні з червоними променями видимого спектра. Поєднане їх застосування найдоцільніше в медико-інструментальній обробці корневих каналів у лікуванні хронічних верхівкових періодонтитів.

Перспективи подальших досліджень

На підставі оцінки результатів проведених досліджень *in vitro* можна припустити, що поєднане застосування фотосенсибілізуючих лікарських засобів та світлових променів може бути ефективним для використання в клінічній практиці. Найефективнішим у клінічній практиці для етіотропного лікування хронічних періодонтитів може бути поєднане застосування променів червоної ділянки спектра з 2% водним розчином метиленового синього.

Література

1. Иорданишвили А. К. Эндодонтия плюс / А. К. Иорданишвили, А. М. Ковалевский. – СПб. : Нор-Мед-Издат, 2001. – 184 с.
2. Николишин А. К. Современная эндодонтия практического врача / А. К. Николишин. – Полтава : Дивосвіт, 2007. – 236 с.
3. Политун А. М. Медикаментозная обработка корневых каналов: клинические аспекты / А. М. Политун // Современная стоматология. – 1999. – № 1. – С. 20– 23.
4. Клинические аспекты современной эндодонтии / [А. П. Педорез, Г. И. Донский, В. Н. Шабанов, С. И. Максютенко]. – Донецк, 1999. – 290 с.
5. Барияк А. Я. Оптичні властивості дентину і ефективність спектральних режимів лазерної обробки кореневого каналу / А. Я. Барияк // Фотобіологія та фотомедицина. – 2007. – № 3–4. – С. 44–49.
6. Burns T. Sensitization of cariogenic bacteria killing to killing from a helium-neon laser / T. Burns, M. Wilson, G. J. Pearson // J. Med. Microbiol. – 1993. – № 38. – P. 401–405.
7. Burns T. Killing of cariogenic bacteria by light from a gallium aluminium arsenide diode laser / T. Burns, M. Wilson, G. Pearson // J. Dent. – 1994. – № 22. – P. 273–278.
8. Наумович С. А. Фотодинамическая терапия в лечении заболеваний периодонта / С. А. Наумович, А. В. Кувшинов // Белорусский медицинский журнал. – 2007. – № 1. – С. 71–75.

9. Бактеріологія і вірусологія : нормативне виробничо-практичне видання. – К. : МНІАЦ медичної статистики ; МВЦ Медінформ, 2004. – 560 с.

10. Лабинская А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований / А. С. Лабинская. – М. : Медицина, 1978. – 386 с.

11. Пат. на корисну модель №47884 Україна МПК (2009) А61С 5/02. Спосіб внутрішньо каналної фотоактивованої дезінфекції кореневих каналів / Сідаш Ю.

В., Ніколішин А. К., Доценко В. І., Макаренко В. І.; заявник та патентовласник Вищий державний навчальний заклад України «Українська медична стоматологічна академія» та Інститут стоматології АМН України. – № у 2009 09669; заявл. 21. 09. 09; опубл. 25. 02. 10, Бюл. №4.

Стаття надійшла

1. 03. 2010 р.

Резюме

В данной работе изучено антибактериальное действие красного (545-640 нм), зеленого (538-583 нм) и синего (360-530 нм) участков видимого спектра; антисептических растворов, которые имеют фотосенсибилизирующее действие: метиленового синего, хлорофиллипта и риванола. Была определена антибактериальная активность при их сочетанном использовании с целью использования фотоактивированной дезинфекции в комплексном лечении хронических верхушечных периодонтитов.

Ключевые слова: фотосенсибилизатор, метиленовый синий, хлорофиллипт, риванол, излучение, микроорганизмы.

Summary

In this paper we studied the antibacterial effect of red (545-640nm), green (538-583nm) and blue (360-530nm) sections of the visible spectrum, antiseptic solutions with photosensitized action: methylene blue, chlorophyllipt and rivanol. The antibacterial activity was determined during their combined use. To use photoactive disinfection of root canals in the complex treatment of chronic apical periodontitis.

Key words: photosensitizer, methylene blue, chlorophyllipt, rivanol, spectra, microorganisms.