

ЛАЗЕРНА АКТИВАЦІЯ АНТИБАКТЕРІАЛЬНОЇ ДІЇ ФОТОСЕНСИБІЛІЗАТОРІВ НА ОДОНТОПАТОГЕННІ МІКРООРГАНІЗМИ

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького (м. Львів)

vasildac@gmail.com

Дана робота є фрагментом науково-дослідної теми кафедри стоматології дитячого віку Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького «Вивчення чинників ризику виникнення стоматологічних захворювань у дітей, обґрунтування методів та засобів їх профілактики та лікування», державний реєстраційний № 0105U007869.

Вступ. Застосування низькоінтенсивного лазерного випромінювання в медицині пов'язано з фотохімічними та фотофізичними ефектами, що виникають при взаємодії стимульованого світлового потоку з певними хімічними речовинами та структурами організму. Такі ефекти значно посилюються при використанні фотосенсибілізаторів – речовин, хімічна активність яких змінюється при взаємодії з квантами світла [4]. Здатність впливати на розвиток запального процесу зумовили використання лазерного опромінення в комплексі з фотосенсибілізаторами в стоматології [1]. Виявлено, що низькоінтенсивне лазерне випромінювання спричиняє антимікробний вплив на умовно-патогенні симбіонти ротової порожнини [3]. Доведено лікувальний вплив фотосенсибілізаторів, активованих лазерним випромінюванням при експериментальному пародонтиті [2]. При цьому виявлено антимікробну та протизапальну дію фотодинамічної терапії, такі ефекти не виявлені при окремому застосуванні лазера та фотосенсибілізатора.

Мета дослідження – дослідити комбіновану дію фотосенсибілізаторів та короточасного лазерного опромінення на стандартні та клінічні штами бактерій з потенційними одонтопатогенними властивостями.

Об'єкт і методи дослідження. Досліджено культури мікроорганізмів: стандартні штами *S. Aureus* (ATCC 25923F-49) і *E. Coli* (ATCC 25922), а також штами, виділені від хворих з пародонтитом – *S. aureus* (6 штамів), *E. coli* (3 штами), *Str. pyogenes* β-гемолітичний (6 штамів), α-гемолітичний стрептокок (6 штамів) і негемолітичний стрептокок (6 штамів). Досліджувалась антибактеріальна дія фотосенсибілізаторів (ФС) – метиленово синього (МС) та хлорофіліпту (ХФ). Джерело лазерного випромінювання – лазерна установка «Granum» (Спектрум Інтернешнл, Инк, США), потужністю 400 мВт та довжиною хвилі 660±5 нм. Змиви до-

бових культур на щільних середовищах розводились в ізотонічному розчині натрій-хлориду за стандартом каламутності до концентрації 1 ОД/мл. З цієї суспензії готували робочі розведення кожної з культур до концентрацій, що забезпечували появу не менше 50 колоній при посіві 0,2 мл на щільні середовища. Суспензії вносились у лунки об'ємом 0,2 мл пластмасової панелі або в розчині ФС. При цьому встановлювалась концентрація ФС, яка спричиняла антибактеріальний ефект при експозиції 60 сек. Для цього готували розчини ФС 1:2, 1:4, 1:8 і 1:16. Тривалість лазерного опромінення вибрана з таким розрахунком, щоб уникнути безпосереднього бактерицидного впливу лазерного опромінення на бактерії і становила 30 сек. і 60 сек. Використана методика давала можливість встановити лазерну активацію антимікробної дії фотосенсибілізаторів. Контрольні лунки не піддавались опроміненню. Після опромінення вміст лунки розводився 1:10, щоб уникнути антибактеріальної дії препаратів при посіві на щільні середовища. Посівна доза становила 0,2 мл, що було кратним об'єму лунок. Посів здійснювали у чашки Петрі з МПА та кров'яним агаром, а через 24 год. підраховувалась кількість колоній та наявність гемолізу на КА. На кожен варіант досліду посіви здійснювали в 6 лунок панелі з наступним підрахунком середнього числа колоній. При статистичній обробці, враховуючи дискретність числових значень, середня кількість колоній заокруглювалась до цілих чисел. Результати дослідження опрацьовані математичним методом з використанням критеріїв Стьюдента.

Результати досліджень та їх обговорення. Результати дослідження антибактеріальної дії фотосенсибілізаторів метиленового синього та хлорофіліпту наведені в **табл. 1**.

Встановлено, що антибактеріальна дія метиленового синього на стандартні та клінічні штами бактерій з потенційною одонтопатогенною дією є слабо вираженою. У розведенні 1:2 кількість КУО стандартного штаму *S. aureus* в контролі становила $46,0 \pm 4,1$ КУО (0,2/мл), при дії метиленового синього (МС) у розведенні 1:2 $-39,0 \pm 3,21$ КУО (0,2/мл), тобто різниця статистично недостовірною ($P > 0,05$). У розведеннях 1:4, 1:8 та 1:16 метиленовий синій не впливав на стандартний штам стафілокока. Подібний ефект виявлено й щодо дії ме-

Вплив фотосенсибілізаторів на стандартні та клінічні штами аеробних одонтопатогенних бактерій

Види бактерій	К-сть штамів	0,9% NaCl	Розчини фотосенсибілізаторів								
			контроль	Метиленовий синій у розведеннях				Хлорофіліпт у розведеннях			
				1:2	1:4	1:8	1:16	1:2	1:4	1:8	1:16
<i>S. aureus</i> (ст)	1	46,0 ± 4,1	39,0± 3,2	42,0± 4,3	45,0± 4,1	48,0± 3,0	29,0± 4,1	32,0± 2,9	39,0± 3,7	43,0± 4,0	
<i>S. aureus</i> (кл)	6	45,0± 3,7	34± 2,9	43± 3,7	44± 4,1	46± 3,8	27± 1,7	32± 3,1	40± 4,7	47± 4,8	
<i>Str. pyogenes</i> β-гемол. (кл)	6	42,0± 1,8	30,0± 3,7	41,0± 3,0	43,0± 2,1	42,0± 3,1	24,0± 3,1	30,0± 3,5	39,0± 3,8	43,0± 2,1	
<i>Str.sp.α-гемол.</i> (кл)	6	54,0± 4,1	38,0± 3,2	46,0± 4,7	50,0± 2,1	51,0± 2,9	34,0± 1,9	39,0± 2,6	51,0± 4,1	52,0± 3,8	
<i>Str.sp. негемол.</i> (кл)	6	51,0± 4,8	35,0± 3,0	46,0± 3,2	50,0± 2,2	49,0± 2,3	28,0± 3,8	36,0± 1,2	50,0± 4,6	48,0± 4,2	
<i>E. coli</i> (ст)	1	52,0± 3,8	49,0± 1,8	50,0± 4,7	53,0± 3,6	51,0± 4,8	35,0± 1,9	43,0± 4,6	45,0± 4,1	54,0± 2,6	
<i>E. coli</i> (кл)	3	53,0± 4,6	50,0± 3,7	54,0± 2,2	51,0± 2,2	53,0± 4,7	39,0± 3,6	42,0± 1,2	52,0± 1,2	54,0± 4,5	

тиленового синього на клінічний штам *S. aureus*, хоча відмічена тенденція до зменшення кількості КУО цих бактерій під дією даного препарату в розведенні 1:2 – в контролі 45,0±3,7 КУО (0,2/мл), МС 1:2 – 34±2,9 (P<0,05). У вищих розведеннях такої дії МС не відмічено.

Проте, МС виявив антимікробну дію щодо клінічного штаму β-гемолітичного стрептокока. Кількість КУО цих бактерій після інкубації зменшувалась у 1,4 рази при P<0,05. Аналогічний ефект МС виявлено і щодо інших штамів стрептококів – α-гемолітичного (зменшення в 1,4 рази при P<0,05 та не гемолітичного стрептокока (зменшення в 1,3 рази при P<0,05). Не виявлено достовірної різниці при дії МС на стандартний та клінічний штами *E. coli*.

Результати досліджень дії хлорофіліпту (ХФ) на досліджувані мікроорганізми показали, що цей препарат виявив антимікробну активність щодо всіх досліджених штамів бактерій. Кількість КУО стандартного штаму *S. aureus* під дією ХФ в розведенні 1:2 зменшилась в 1,6 рази, в розведенні 1:4 – в 1,5 рази при P<0,05, у розведенні 1:8 в 1,4 рази при P<0,05. Подібна дія виявлена й щодо клінічного штаму *S. aureus* – зменшення кількості колоній у 1,4-1,5 рази при розведеннях 1:2-1:4 (P<0,05). У вищих розведеннях ХФ не спричиняв антимікробного ефекту щодо стафілококів.

ХФ проявив антимікробну активність щодо клінічних потенційно одонтопатогенних видів стрептококів. У розведеннях 1:2-1:4 зменшувалась кількість колоній β-гемолітичного стрептококів 1,8-1,4 рази (P<0,05), – α-гемолітичного – в 1,4-1,5 рази (P<0,05), негемолітичного – в 1,4-1,9 рази. Виявлено також зменшення кількості колоній стандартного та клінічного штамів *E. coli* в 1,4 рази (P<0,05) під дією ХФ у розведенні 1:2.

Таким чином виявлено, що досліджувані фотосенсибілізатори МС та ХФ при 60-секундній експозиції виявляють певний антимікробний ефект більш виражений при дії ХФ.

У наступній серії дослідів оцінювалась комбінована дія 30-ти секундного лазерного опромінення та фотосенсибілізаторів на мікроорганізми. Результати наведені в **табл. 2**. Результати дослідження показують, що при такій експозиції лазерне опромінення суспензії бактерій у фізіологічному розчині не спричинило достовірного зниження кількості висіяних колоній у порівнянні з контролем. При комбінованій дії лазера та МС у розведенні 1:2-1:4 на штам *S. aureus* кількість висіяних колоній зменшувалась в 1,7-1,9 рази, а при дії ХФ в розведенні 1:2 у 3,3 рази, причому антимікробний ефект проявлявся і в розведеннях 1:4 і 1:8 (зменшення кількості КУО в 1,7-2,5 рази при P<0,05). При комбінованій дії лазера та МС зменшувалась кількість колоній клінічного штаму *S. aureus* в 1,4-1,7 рази; при дії лазера та ХФ антимікробний ефект проявлявся у розведеннях 1:2 -1:8, причому зменшення кількості колоній становило від 1,4 до 5 разів.

У цій серії експериментів показано, що комбінована дія лазера та МС спричиняє антимікробний ефект щодо усіх досліджуваних видів стрептококів – β-гемолітичного стрептокока в 1,9-2,5 рази (P<0,05), – α-гемолітичного – в 2-2,4 рази (P<0,05), негемолітичного – в 1,8-2,1 рази. Більш вираженою була комбінована дія лазерного опромінювання та ХФ на стрептококи. Кількість КУО β-гемолітичного стрептокока зменшувалась у 2,5-3,6 рази (P<0,05), – α-гемолітичного – в 2,4-3,2 рази (P<0,05), негемолітичного – в 1,8-3,1 рази. Таким чином, виявлена значна лазерна активація антимікробної дії фотосенсибілізаторів МС та ХФ на грампозитивні коки з потенційними одонтопатогенними властивостями.

МЕТОДИ ТА МЕТОДИКИ

Таблиця 2.

Лазерна активація антимікробної дії фотосенсибілізаторів при експозиції 30сек

Види бактерій	К-сть штамів	0, 9% NaCl		Розчини фотосенсибілізаторів (опромінення 30 сек)							
		Контр.	Опр. 30 сек.	Метиленовий синій у розведеннях)				Хлорофіліпт у розведеннях			
				1: 2	1:4	1:8	1:16	1:2	1: 4	1:8	1:16
<i>S. aureus</i> (ст)	1	46,0 + 3,1	43,0 + 2,1	25,0+ 2,2	29,0+ 1,8	40,0+ 2,9	45,0+ 3,7	14,0+ 0,6	18,0+ 1,9	29,0+ 3,0	43,0+ 3,7
<i>S. aureus</i> (кл)	6	45,0+ 3,2	43,0 + 3,1	26+ 2,9	32+ 1,7	42+ 3,1	44+ 1,8	13+ 1,7	16+ 1,1	33+ 2,5	44+ 2,8
<i>Str. pyogenes</i> β-гемол. (кл)	6	43,0+ 2,5	41,0 + 3,1	16,0+ 1,7	22,0+ 1,0	38,0+ 1,1	44,0+ 3,1	12,0+ 1,1	18,0+ 1,5	26,0+ 3,1	42,0+ 2,7
<i>Str. sp. α-гемол.</i> (кл)	6	49,0+ 3,1	46,0 + 3,2	18,0+ 2,2	24,0+ 2,7	40,0+ 2,7	46,0+ 3,9	15,0+ 0,9	20,0+ 2,0	28,0+ 1,7	46,0+ 3,8
<i>Str. sp. негемол.</i> (кл)	6	44,0+ 2,8	41,0 + 3,1	21,0+ 3,1	26,0+ 3,2	39,0+ 2,2	45,0+ 3,3	14,0+ 1,8	25,0+ 1,2	34,0+ 2,6	43,0+ 4,1
<i>E. coli</i> (ст)	1	51,0+ 3,2	49,0+ 3,2	34,0+ 2,2	39,0+ 3,8	40,0+ 3,2	53,0+ 3,2	30,0+ 3,2	29,0+ 3,2	32,0+ 2,2	51,0+ 3,1
<i>E. coli</i> (кл)	3	53,0+ 3,2	49,0 + 3,7	36,0+ 3,3	39,0+ 2,2	48,0+ 2,1	53,0+ 4,7	32,0+ 1,6	38,0+ 1,8	42,0+ 4,2	51,0+ 4,0

Дія МС та ХФ на стандартні та клінічні штами грамнегативних бактерій *E. coli* також підсилювалась під впливом лазерного опромінення, але зменшення кількості КУО було не таким значним і становило для МС 1,2-1,4 рази, а для ХФ – 1,3-1,6 рази.

В таблиці 3 наведені результати активації 60-ти секундним лазерним опроміненням проти-мікробної дії МС і ХФ.

Результати досліджень свідчать, що збільшення експозиції лазерного опромінення посилювало антимікробний ефект при комбінованій дії фотосенсибілізаторів і лазера. При дії лазера на суспензію бактерій в ізотонічному розчині натрій-хлориду не відмічено значного бактерицидного впливу, хоча для всіх видів бактерій проявилась тенденція до деякого зниження кількості КУО – на 10-12% при P>0.05.

Таблиця 3.

Лазерна активація антимікробної дії фотосенсибілізаторів при експозиції 60 сек.

Види бактерій	К-сть штамів	0, 9% NaCl		Розчини фотосенсибілізаторів (опромінення 60 сек)							
		Контр.	Опр. 60 сек.	Метиленовий синій у розведеннях)				Хлорофіліпт у розведеннях			
				1: 2	1:4	1:8	1:16	1:2	1: 4	1:8	1:16
<i>S. aureus</i> (ст)	1	44,0 ± 2,1	40,0 ± 2,3	18,0± 1,2	24,0± 1,8	39,0± 2,7	40± 3,0	10,0± 0,5	15,0± 1,1	22,0± 2,0	38,0± 1,7
<i>S. aureus</i> (кл)	6	46,0± 3,2	41,0 ± 2,1	16± 2,1	21± 1,2	40± 2,1	45± 2,8	11± 0,7	15± 1,7	24± 2,9	43± 2,4
<i>Str. pyogenes</i> β-гемол. (кл)	6	42,0± 2,4	38,0 ± 2,1	12,0± 0,7	18,0± 1,6	32,0± 1,8	40,0± 3,5	6,0± 0,4	12,0± 1,3	17,0± 2,1	40,0± 2,7
<i>Str. sp. α-гемол.</i> (кл)	6	48,0± 2,1	43,0 ± 2,2	13,0± 1,2	16,0± 1,7	39,0± 2,7	46,0± 3,3	8,0± 0,7	14,0± 1,0	21,0± 2,7	42,0± 3,8
<i>Str. sp. негемол.</i> (кл)	6	46,0± 2,3	42,0 ± 2,1	16,0± 2,1	23,0± 2,2	30,0± 3,2	44,0± 3,7	8,0± 0,8	15,0± 1,7	24,0± 2,2	42,0± 3,1
<i>E. coli</i> (ст)	1	53,0± 3,2	50,0± 3,1	28,0± 1,2	30,0± 1,8	41,0± 3,2	55,0± 3,0	25,0± 2,2	28,0± 2,3	35,0± 2,7	52,0± 3,6
<i>E. coli</i> (кл)	3	51,0± 3,5	48,0 ± 2,7	26,0± 2,3	31,0± 2,2	43,0± 2,6	49,0± 3,7	22,0± 1,7	26,0± 1,1	34,0± 2,2	52,0± 3,0

Комбінована дія МС в розведенні 1:2 та лазерного опромінення на стафілококи проявилась у зниженні КУО в 1,9-2,4 рази для стандартного та клінічного штаму. При розведенні 1:4 МС в комбінації з лазерним опроміненням спричиняв зниження кількості КУО стафілококів в 1.8-2 рази. Дія лазерного опромінення в комбінації з ХФ спричинила зниження кількості КУО стафілококів у 4-7 разів при розведенні ХФ у два рази, в 3 рази при розведенні 1:4 і в 2 рази при розведенні 1:8.

Для всіх досліджуваних штамів стрептококів зниження кількості КУО становило у 6-7 разів при розведенні 1:2 і в 3 рази при розведенні 1:4, і в 2-2,2 рази при розведенні 1:8. Кількість колоній *E. coli* при комбінованій дії ХФ та лазера зменшувалась 1,6 -2,2 рази, в залежності від розведення препарату.

Висновки

1. Виявлено посилення антимікробної дії метиленової синьки та хлорофіліпту під впливом лазерного опромінення щодо грампозитивних та грамнегативних бактерій з потенційною одонтопатогенною дією.

2. Антимікробний ефект комбінованої дії фотосенсибілізаторів і лазера залежав від тривалості опромінення та концентрації препарату.

3. Антимікробний ефект лазерного опромінення та фотосенсибілізаторів більшою мірою виявлявся щодо грампозитивних коків ніж до грамнегативних бактерій.

Перспективи подальших досліджень. В подальшому планується встановити оптимальні час опромінення та концентрацію для кожного з ФС для розробки ефективної схеми антимікробної терапії одонтопатогенної мікрофлори.

Література

1. Кречина Е. К. Патогенетическое обоснование лечения заболеваний пародонта методом фотодинамической терапии / Е.К. Кречина, Н. Е. Ефремова, В. В. Маслова // Стоматология. – 2006. – № 4. – С. 20-25.
2. Наумович С. А. Фотодинамическая терапия в лечении заболеваний пародонта (экспериментальное исследование) / С.А. Наумович, А. В. Кувшинов. – БГМУ Информация БМЖ. – 2007. – № 1 (19). – С. 34.
3. Панас М. А. Вплив низько інтенсивного лазерного випромінювання на умовно-патогенні мікробні симбіонти ротової порожнини: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук / М. А. Панас. – Вінниця. – 2015. – 21 с.
4. Цыб А. Ф. Фотодинамическая терапия / А. Ф. Цыб, М. А. Каплан, Ю. С. Романко, В. В. Попучиев. – М.: МИА, 2009. – 195 с.

УДК 616.314–008.87–085.849.19:615.452

ЛАЗЕРНА АКТИВАЦІЯ АНТИБАКТЕРІАЛЬНОЇ ДІЇ ФОТОСЕНСИБІЛІЗАТОРІВ НА ОДОНТОПАТОГЕННІ МІКРООРГАНІЗМИ

Смоляр Н. І., Корнійчук О. П., Дацко В. А., Федечко Й. М.

Резюме. У даній роботі представлені результати дослідження комбінованої дії фотосенсибілізаторів та короткочасного лазерного опромінення на стандартні та клінічні штами бактерій з потенційними одонтопатогенними властивостями. Досліджена антибактеріальна дія фотосенсибілізаторів – метиленово синього та хлорофіліпту під впливом лазерного випромінювання на стандартні і виділені від хворих з пародонтитом культури мікроорганізмів. Встановлено, що антибактеріальна дія метиленового синього та хлорофіліпту на стандартні та клінічні штами є слабо вираженою. Однак, при поєднанні з 30-ти та 60-ти секундним лазерним опроміненням виявлено значний антимікробний ефект щодо усіх досліджуваних видів мікроорганізмів, в тому числі і у високих розведеннях. Антимікробний ефект комбінованої дії фотосенсибілізаторів і лазера залежав від тривалості опромінення та концентрації препарату.

Ключові слова: лазер, фотосенсибілізатор, одонтопатогенні мікроорганізми.

УДК 616.314–008.87–085.849.19:615.452

ЛАЗЕРНАЯ АКТИВАЦИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ НА ОДОНТОПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

Смоляр Н. И., Корнейчук Е. П., Дацко В. А., Федечка И. М.

Резюме. В данной работе представлены результаты исследования комбинированного действия фотосенсибилизаторов и кратковременного лазерного облучения на стандартные и клинические штаммы бактерий с потенциальными одонтопатогенными свойствами. Исследовано антибактериальное действие фотосенсибилизаторов – метиленового синего и хлорофиллипта под воздействием лазерного излучения на стандартные и выделенные от больных с пародонтитом культуры микроорганизмов. Установлено, что антибактериальное действие метиленового синего и хлорофиллипта на стандартные и клинические штаммы являются слабо выраженными. Однако, при сочетании с 30-ти и 60-ти секундным лазерным облучением выявлен значительный антимикробный эффект в отношении всех исследуемых видов микроорганизмов, в том числе и в высоких разведениях. Антимикробный эффект комбинированного действия фотосенсибилизаторов и лазера зависел от продолжительности облучения и концентрации препарата.

Ключевые слова: лазер, фотосенсибилизатор, одонтопатогенные микроорганизмы.

UDC: 616.314–008.87–085.849.19:615.452

THE LASER ACTIVATION OF PHOTSENSITIZERS' ANTIBACTERIAL EFFECT ON ODONTO PATHOGENIC MICROORGANISMS

Smolyar N. I., Korniychyk O. P., Dacko V. A., Fedechko J. M.

Abstract. Aim. In this work the investigation results of combined photosensitizers' effect and momentary laser radiation on standard and clinical bacteria's strains with potential odonto pathogenic properties have been performed.

Methods. The antibacterial photosensitizers' effect of methylene blue and chlorophyllipt under the influence of laser radiation on standard and extracted from patients with periodontitis microorganisms' cultures has been investigated.

All microorganisms' cultures have been put in to photosensitizer's solvent. All solvents have been prepared as a dilution of 1:2, 1:4, 1:8 and 1:16. The duration of laser irradiation was 30 seconds and 60 seconds. The controls haven't been irradiated. After irradiation, wells' contents have been diluted of 1:10 and plated on dense environment. After 24 hours of expectance the amount of colonies have been calculated. For all experimental options the sowings have been performed at six wells' panel and the average amount of colonies have been calculated.

Results. This investigation has been conditionally spited in to 3 steps: the exploration of photosensitizers' without laser irradiation; with 30 seconds and 60 seconds irradiation. It has been explored that the antibacterial effect of methylene blue and chlorophyllipt on standard and clinical stamps has been slightly expressed. In dilutions it is practically absent. But the effect is more significant for chlorophyllipt. During following explorations' series the combined effect of 30 seconds and 60 seconds laser irradiation and photosensitizers on microorganism has been estimated. The significant antibacterial effect has been identified including eminently dilutions. If the irradiation has been occurred as 30 seconds the amount of sown colonies will be decrease in 1.4-5 times. If the irradiation has been occurred as 60 seconds the amount of sown colonies will decrease in 1.8-7 times. The increase of laser irradiation will intensified the antibacterial effect.

Conclusions.

1. The amplification of antibacterial effect of methylene blue and chlorophyllipt under the influence of laser radiation for gram-positive and gram negative bacteria with potential odonto pathogenic influence has been determined.

2. The antibacterial effect of combined photosensitizer's and laser usage depends on the duration of irradiation and concentration of medicine.

3. The antibacterial effect of laser irradiation is more significant for gram-positive than for and gram-negative bacteria.

Keywords: laser, photosensitizer, odonto pathogenic microorganisms.

*Рецензент – проф. Лобань Г. А.
Стаття надійшла 10.11.2015 року*