

Ковальчук Валентин Петрович - д.мед.н., професор кафедри мікробіології, вірусології та імунології Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова; +38 0432 53-03-79
 Фоміна Надія Сергіївна - к.мед.н., доцент кафедри мікробіології, вірусології та імунології Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова; +38 0432 53-03-79

© Панас М.А., Корнійчук О.П.

УДК: 576.851.48: (615.849.19+615.33):616.31

Панас М.А., Корнійчук О.П.

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького кафедра мікробіології, вірусології та імунології (вул. Пекарська, 69, м. Львів, Україна, 79010)

ПОЄДНАНИЙ ВПЛИВ НИЗЬКОІНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ ТА АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ НА МОДЕЛІ *ESCHERICHIA COLI*

Резюме. Метою нашого дослідження вивчити ефективність поєднаного застосування антибактеріальних препаратів та низькоінтенсивного лазерного випромінювання на *Escherichia coli* при пародонтиті. Обстежено вікову групу 30-45 років у 40 осіб із пародонтитом. Виділені 7 штамів *E. coli* та референтний штам *E. coli* ATCC № 25922 використовували для дослідження впливу лазерного випромінювання, при поєднаному використанні із антибактеріальними (АБ) препаратами впродовж 5 хв. та без використання лазерного випромінювання. При поєднаному застосуванні НІЛВ та рифампіцину спостерігалась відсутність ростових показників, а при поєднаному застосуванні амоксицилін/клавулат та лазерного випромінювання цей показник становив $8,0 \pm 0,8$ КУО/мл ($p < 0,001$). При опроміненні протягом 5 хв. без додавання антибіотиків спостерігалась стимуляція росту виділених ізолятів *E. coli*. При додаванні АБП спостерігається значне пригнічення ростових та зміна культуральних властивостей *E. coli*. При застосуванні лише АБ-препаратів спостерігається незначне пригнічення росту.

Ключові слова: *Escherichia coli*, низькоінтенсивне лазерне випромінювання, антибіотики, пародонтит.

Вступ

Escherichia coli, яка не відноситься до нормальної мікрофлори ротової порожнини є індикатором розвитку дисбіозу у вказаній екологічній ніші і нерідко висівається при пародонтиті [Черета, 2007; Рединоваи др., 2009; Байрамов, 2010]. Одним із основних етіологічних факторів запальних захворювань пародонту являється зубний наліт, який складається із багаточисленних мікроорганізмів, які володіють високою патогенністю - адгезивністю на поверхні зубів та інвазивністю до тканинних структур [Косенко и др., 2000]. Захворювання пародонту викликаються полімікробною змішаною інфекцією, яка включає *Actinobacillus actinomycetem comitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteriodes forsythus*, *Campilobacter rectus*, *Peptostreptococcus micros*, *Pseudomonas spp.*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Candida spp.* [Кухарская, Король, 2007].

Однією з причин виникнення даного стану є неадаптоване та нераціональне використання антибактеріальних препаратів, що призводить до збільшення кількості полірезистентних штамів бактерій [Байрамов, 2010]. Процес зростання кількості стійких штамів мікроорганізмів до хіміотерапевтичних препаратів, які широко застосовуються в клініці, погіршують результати лікування, зокрема, ентерококової етіології. На сучасному етапі лікування пародонтиту використовують бактеріотоксичну терапію (БТС-терапія) або фотодинамічну терапію (ФДТ) із використанням фотосенсибілізуючого компонента, які базуються на знищенні мікробного фактора під впливом лазерного випромінювання із певною довжиною хвилі. Антибактеріальна дія лазера

являється важливим аспектом його багатофакторного впливу на біологічні системи [El-Adly et al., 2007; Wainwright, 2009; Tianhong et al., 2009].

Метою нашого дослідження вивчити ефективність поєднаного застосування антибактеріальних препаратів та низькоінтенсивного лазерного випромінювання (НІЛВ) на *Escherichia coli* при пародонтиті.

Матеріали та методи

Для дослідження поставленої мети було обстежено ротову порожнину 40 осіб із пародонтитом, що звернулися у лікувальний заклад до лікування віком 30-45 років.

Матеріалом для мікробіологічного дослідження слугували вміст пародонтальних кишень. Для запобігання контамінації матеріалу мікрофлорою навколишнього середовища, збір проводився стерильним екскаватором з дотриманням правил асептики. Біологічний субстрат засівався протягом однієї години з моменту узяття матеріалу на поживні середовища: кров'яний агар, м'ясо-пептонний агар, середовище Ендо для виділення грамвід'ємної флори, зокрема, ешерихій, які інкубували при 37°C протягом 24 год. При пародонтиті було виділено 7 штамів *E. coli*. Родову приналежність бактерій аеробної ланки визначали на основі морфологічної та тинкторіальної характеристик (виготовлення мазка та фарбування його за Грамом), культуральних властивостей (визначення форми та величини колоній, характеру їх країв та поверхні, структури, консистенції колоній) та встановлення відповідних біохімічних ознак.

Чисті культури, виділені від хворих, було використано для проведення подальших досліджень впливу лазерного випромінювання. Для контролю досліджувався референтний штам *E. coli* ATCC № 25922.

Джерелом випромінювання був лазерний діодний модуль BAKU BK - 1502DD синього спектру з довжиною хвилі 445 нм, вихідна потужність якого задавалася постійним струмом накачки.

Опромінення зависі культури *E. coli* із стандартом мутності 1,0 McFarland здійснювали у стерильних планшетах об'ємом 0,1 мл, яку розводили до 10^4 КУО/мл. Із кінцевого розведення забиралась зависі культури об'ємом 0,1 мл та вносились до лунок у стерильні планшети. Для встановлення чутливості антибактеріальних препаратів використовували метод дворазових серійних розведень в бульйонах Мюллера-Хінтона [Наказ, 2007]. Отримане розведення АБП 1:160 додавали до кінцевої зависі культури *E. coli* об'ємом 1,0 мл, після чого носили по 0,1 мл отриманої суспензії до планшета. Опромінення здійснювали у логарифмічній фазі росту із поступовим збільшенням експозиції протягом 5, 10, 15, 20 та 30 хв. лазерним променем синього спектру з довжиною хвилі 445 нм потужністю 700 мВт. Після опромінення, весь об'єм зависі культури (0,1 мл) пересіювали мікропіпеткою на тверде поживне середовище, розсівали шпателем і витримували у термостаті при температурі 37°C. Через 24 години підраховували кількість колоній та порівнювали отримані результати із контрольною групою (неопромінена культура).

Статистичне обрахування проводилось з використанням пакету прикладних програм для статистичного аналізу даних медико-біологічних досліджень "Instat"

(GraphPad Software Inc., 1993). Під час статистичної обробки були отримані результати у вигляді середнього значення досліджуваного параметра (M), стандартної похибки (відхилення) досліджуваного параметра (m) та показника достовірності (p).

Результати. Обговорення

Експеримент полягав у дослідженні ефективності застосування антибактеріальних препаратів як у поєднанні із НІЛВ синього спектру та без впливу лазерного випромінювання.

Результати щодо ефективності дії лазерного променя на *E. coli* представлені у табл. 1. Згідно отриманих даних, встановлено, що повного пригнічення росту виділених штамів не спостерігається. При опроміненні НІЛВ *E. coli* протягом 30 хв. кількість мікроорганізмів склала $25,7 \pm 1,3$ КУО/мл ($p < 0,001$) у осіб із пародонтитом та для референтного штаму - $17,4 \pm 1,6$ КУО/мл ($p < 0,001$). При використанні НІЛВ протягом 5 хв. спостерігалась стимуляція росту як виділених штамів у осіб із пародонтитом, так і референтного штаму, оскільки цей показник становив $52,9 \pm 1,2$ КУО/мл ($p < 0,05$) та $40,4 \pm 1,4$ КУО/мл ($p < 0,001$) відповідно.

При поєднаному застосуванні НІЛВ протягом 5 хв. з антибактеріальними препаратами (табл. 2) спостерігалось значне пригнічення росту мікроорганізмів, а при поєднанні НІЛВ із рифампіцином - повна відсутність росту ізолятів. При використанні лише рифампіцину мікробне число *E. coli* склало $8,3 \pm 1,0$ КУО/мл ($p < 0,001$) у осіб із пародонтитом та референтного штаму - $9,5 \pm 1,7$ КУО/мл ($p < 0,001$). При поєднаному застосуванні цефалексину із лазерним випромінюванням на *E. coli* із па-

Таблиця 1. Інтенсивність росту *Escherichia coli* при різній експозиції опромінення.

Походження ізолятів	Кількість культур	Експозиція					
		неопромінені	5хв	10хв	15хв	20хв	30хв
Пародонтит	7	$36,3 \pm 1,3^{**}$	$52,9 \pm 1,2^*$	$41,4 \pm 1,4^*$	$40,9 \pm 1,0^{**}$	$36,5 \pm 1,1^{**}$	$25,7 \pm 1,3^{**}$
Референтний штам <i>E. coli</i> ATCC № 25922	1	$38,0 \pm 1,3^*$	$40,4 \pm 1,4^{**}$	$37,7 \pm 1,3^*$	$36,8 \pm 1,2^*$	$25,8 \pm 1,4^{**}$	$17,4 \pm 1,6^{**}$

Таблиця 2. Інтенсивність росту *Escherichia coli* при поєднаному застосуванні антибактеріальних препаратів та НІЛВ.

Походження <i>E. coli</i>		Ізоляти від осіб з пародонтитом	Референтний штам <i>E. coli</i> ATCC № 25922
Кількість культур		7	1
Антибактеріальні препарати	Амоксицилін/клавулат	$21,4 \pm 1,2$ ($p < 0,001$)	$20,4 \pm 1,6$ ($p > 0,05$)
	Цефотаксим	$13,2 \pm 1,3$ ($p < 0,001$)	$15,4 \pm 1,1$ ($p > 0,05$)
	Лінкоміцин	$19,7 \pm 1,8$ ($p > 0,05$)	$19,0 \pm 1,5$ ($p > 0,05$)
	Цефалексин	$13,1 \pm 1,4$ ($p < 0,001$)	$15,3 \pm 1,7$ ($p > 0,05$)
	Рифампіцин	$8,3 \pm 1,0$ ($p < 0,001$)	$9,5 \pm 1,7$ ($p < 0,001$)
Антибактеріальні препарати із НІЛВ	Амоксицилін/клавулат із лазерним випромінюванням	$8,0 \pm 0,8$ ($p < 0,001$)	$7,7 \pm 1,1$ ($p > 0,05$)
	Цефотаксим із лазерним випромінюванням	$2,6 \pm 1,0$ ($p < 0,001$)	$2,0 \pm 0,8$ ($p > 0,05$)
	Лінкоміцин із лазерним випромінюванням	$7,3 \pm 1,0$ ($p < 0,001$)	$7,7 \pm 1,0$ ($p > 0,05$)
	Цефалексин із лазерним випромінюванням	$6,7 \pm 1,7$ ($p < 0,001$)	$6,9 \pm 1,0$ ($p > 0,05$)
	Рифампіцин із лазерним випромінюванням	0 ($p > 0,05$)	0 ($p > 0,05$)

родонтальних кишень мікробне число склало - $6,7 \pm 1,7$ КУО/мл ($p < 0,001$), а за відсутності НІЛВ цей показник становив $13,1 \pm 1,4$ КУО/мл ($p < 0,001$). Інтенсивність ростових показників референтного штаму склало $15,3 \pm 1,7$ КУО/мл ($p < 0,05$) та $6,9 \pm 1,0$ КУО/мл ($p < 0,05$). При використанні амоксицилін/клавунату для дослідження штамів *E. coli* цей показник склав - $21,4 \pm 1,2$ КУО/мл ($p < 0,001$) та для референтного штаму - $20,4 \pm 1,62$ КУО/мл ($p < 0,05$), а при поєднаному застосуванні цей показник знизився до $8,0 \pm 0,8$ КУО/мл ($p < 0,001$) при пародонтиті та $7,7 \pm 1,1$ КУО/мл ($p < 0,05$) у референтного штаму. Ізольоване застосування цефотаксиму спричинило пригнічення росту *E. coli* при пародонтиті до $13,2 \pm 1,3$ КУО/мл ($p < 0,001$) та до $15,4 \pm 1,1$ КУО/мл ($p < 0,05$) для референтного штаму. При поєднаному використанні цей показник знизився при пародонтиті до $2,6 \pm 1,0$ КУО/мл ($p < 0,001$) та референтному штаму - $2,0 \pm 0,8$ КУО/мл ($p < 0,05$). При застосуванні лінокміцину із лазерним випромінюванням кількість мікробних клітин *E. coli* склала $7,3 \pm 1,0$ КУО/мл ($p < 0,001$) у осіб із пародонтитом та при дії на референтний штам - $7,7 \pm 1,08$ КУО/мл ($p < 0,05$). За відсутності лазерного випромінювання цей показник склав при пародонтиті - $19,7 \pm 1,8$ КУО/мл ($p < 0,05$) та на референтний штам - $19,0 \pm 1,5$ КУО/мл ($p < 0,05$).

Висновки та перспективи подальших розробок

1. При проведенні аналізу отриманих даних щодо

дії низькоінтенсивного лазерного випромінювання синього спектру 445 нм на штами *Escherichia coli*, виділених із пародонтальних кишень та референтного штаму, встановлено різну ступінь впливу в залежності від тривалості опромінення. При використанні лазерного променя протягом 5 хв. спостерігалась стимуляція росту із поступовим зниженням до 30 хв. Повного пригнічення ростових властивостей не спостерігалось, що вказує на бактеріостатичний ефект даного випромінювання.

2. При поєднаному застосуванні НІЛВ протягом 5 хв. із антибактеріальними препаратами на ізоляти *E. coli*, виділених у осіб із пародонтитом встановлено значну ефективність протимікробної активності діючих факторів. При поєднаному застосуванні рифампіцину та НІЛВ спостерігалась відсутність росту клінічних штамів *E. coli*. При використанні лише антибактеріальних препаратів, їх ефективність значно нижча.

3. НІЛВ може спричиняти як стимулюючий вплив при тривалості експозиції 5 хв. та пригнічуючий ефект при поєднаному використанні із антибіотиками.

Подальші перспективи: вивчення ефективності низькоінтенсивного лазерного випромінювання (НІЛВ) синього спектра на мікроорганізми, виділених з ротової порожнини; використання НІЛВ в комплексі з іншими терапевтичними засобами; застосування НІЛВ як перспективного методу лікування карієсу зубів та пародонтиту.

Список літератури

- Байрамов Г.Р. Исследование пародонто-патогенной микрофлоры и ее этиологическая значимость в формировании разных клинических форм воспалительных заболеваний пародонта / Г.Р. Байрамов // Пародонтология. - 2010. - № 2(54). - С. 84-86.
- Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів: Міністерство охорони здоров'я України 05.04.2007 № 167 [Наказ про затвердження методичних вказівок].
- Кухарская О.Г. Микробиологический баланс полости рта у больных пародонтитом / О.Г. Кухарская, М.Д. Король // Український стоматологічний альманах. - 2007. - № 1. - С. 58-61.
- Микробиологические и клинические характеристики дисбиотического состояния в полости рта / Т.Л. Редина, Л.А. Иванова, О.В. Мартюшева и др. // Стоматология. - 2009. - № 6. - С. 12-18.
- Микробные ассоциации пародонтального кармана у больных генерализованным пародонтитом / К.Н. Косенко, Ю.Г. Чумакова, Э.А. Городенко и др. // Вісник стоматології. - 2000. - № 3. - С. 10-13.
- Черета В.В. Микрофлора як фактор виникнення запальних хвороб пародонта / В.В. Черета // Український стоматологічний альманах. - 2007. - № 1. - С. 77-79.
- Amira A. El-Adly. Antibacterial Effects of Low Power Laser Light and Volatile Oil of Fennel (*Foeniculum vulgare* var. dulce) on Gram-positive and Gram-negative Bacteria / Amira A. El-Adly, Emad A. Abada, Fatma A. Gharib // International journal of Agriculture and Biology. - 2007. - № 9 (1). - P. 22-26.
- Mark Wainwright. Photoantimicrobials - So what's stopping us? / Mark Wainwright // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. - 2009. - № 6. - P. 167-169.
- Tianhong Daia. Photodynamic therapy for localized infections - State of the art / Tianhong Daia, Ying-Ying Huang, Michael R. Hamblin // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. - 2009. - № 6. - P. 170-188.

Панас М.А., Корнийчук Е.П.

СОЧЕТАННОЕ ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА МОДЕЛИ *ESCHERICHIA COLI*

Резюме. Целью нашего исследования изучить эффективность сочетания антибактериальных препаратов и низкоинтенсивного лазерного излучения на *Escherichia coli* при пародонтите. Обследовано возрастную группу 30-45 лет у 40 человек с пародонтитом. Выделенные 7 штаммов *E. coli* и референтный штамм *E. coli* ATCC № 25922 использовали для исследования воздействия лазерного излучения при совместном использовании с антибактериальными (АБ) препаратами в течение 5 мин. и без использования лазерного излучения. При одновременном применении НИЛИ и рифампицина наблюдалось отсутствие ростовых показателей, а при одновременном применении амоксициллин / клавунат и лазерного излучения этот показатель составлял $8,0 \pm 0,8$ КОЕ / мл ($p < 0,001$). При облучении в течение 5 мин. без добавления антибиотиков наблюдалась стимуляция роста выделенных изолятов *E. coli*. При добавлении АБП наблюдается значительное угнетение роста

вых и изменение культуральных свойств *E. coli*. При применении только АБ - препаратов наблюдается незначительное угнетение роста.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, низкоинтенсивное лазерное излучение, антибиотики, пародонтит

Panas M.A., Korniychuk O.P.

THE COMBINE EFFECT OF LOW-LEVEL LASER RADIATION AND ANTIBACTERIAL DRUGS ON THE MODEL OF ESCHERICHIA COLI

Summary. The aim of our study to examine the effectiveness of a combination of antibacterial drugs and low-level laser radiation on *Escherichia coli* with periodontitis. We examined the age group 30-45 years of 40 people with periodontitis. Dedicated 7 *E. coli* strains and the reference strain *E. coli* ATCC № 25922 was used to examine the effect of laser radiation, when used in conjunction with antibacterial (AB) preparations for 5 min. and without using laser light. With simultaneous application of LLLT and rifampicin observed lack of growth indicators, while the use of amoxicillin / clavunate and laser radiation, the figure was $8,0 \pm 0,8$ CFU / ml ($p < 0,001$). After irradiation for 5 min. without addition of antibiotic growth stimulation been observed isolates of *E. coli*. When adding ABP are observed significant inhibition of growth and change in culture properties of *E. coli*. By use of only AB - drugs there is a slight growth inhibition.

Key words: *Escherichia coli*, low-level laser radiation, antibiotics, periodontitis.

Стаття надійшла до редакції 9.12.2013 р.

Корнійчук Олена Петрівна - д. мед. н., професор, завідувач кафедри мікробіології, вірусології та імунології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького; +38 097 22-55-872

Панас Марта Андріївна - аспірант кафедри мікробіології, вірусології та імунології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького; +38 098 94-38-783

© Торопин В.Н., Бурмистров К.С., Кременчуцкий Г.Н., Торопин Н.В.

УДК: 541(183.12+64):542.944

Торопин В.Н., Бурмистров К.С., Кременчуцкий Г.Н., Торопин Н.В.

ГВУЗ "Украинский государственный химико-технологический университет" (пр. Гагарина, 8, г. Днепропетровск, Украина, 49005); ГУ "Днепропетровская медицинская академия" МЗО Украины (ул. Дзержинского, 9, г. Днепропетровск, Украина, 49600)

ПОЛУЧЕНИЕ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ И АСЕПТИЧЕСКИХ РАСТВОРОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПОЛИМЕРОВ

Резюме. Изучена эмиссия активного хлора из иммобилизованных N-хлорсульфонамидов натрия при действии активаторов аминного типа. Установлено, что концентрация активного хлора в растворе определяется стабильностью хлорированных форм активатора.

Ключевые слова: N-хлорсульфонамид, полимеры, гипохлорит, активация.

Введение

Известно, что растворы хлорноватистой кислоты проявляют антимикробные, фунгицидные, вируцидные и противоглистные свойства, причем у большинства болезнетворных микроорганизмов отсутствует привыкание к таким растворам. Поэтому в медицине наметилась тенденция замены антибиотиков (там, где это возможно) на растворы, содержащие "активный хлор". В качестве источника "активного хлора" (растворов хлорноватистой кислоты) для лечения инфицированных ран и приготовления дезинфицирующих растворов находят N-хлорарилсульфонамиды натрия (хлорамин Б, хлорамин Т и другие N-хлорамины). Однако существенным недостатком хлораминов является попадание в приготавливаемый антимикробный раствор молекул - носителей хлорамидной функции (арилсульфамидов и др.), загрязняющих его.

В этой связи представлялось интересным исследовать возможность применения иммобилизованных N-хлорсульфонамидов натрия на полимерной подложке для приготовления дезинфицирующих и антимикробных растворов. В отличие от обычных N-хлорарилсульфонамидов натрия, при использовании иммобилизо-

ванных N-хлорсульфонамидов сульфамид остается закрепленным на матрице и не попадает в приготавливаемый раствор. Такой сульфамид может быть вновь превращен в N-хлорсульфонамид натрия после соответствующей подготовки и обработки. Полимеры с N-хлорсульфонамидными группами в натриевой форме, привитые к различным полимерным матрицам, известны уже давно [Богочек, Коцилек-Балявейдер, 1987; Nakamura, 1954; Emerson et al., 1978; Bogoczek, Kociulek-Balawejder, 1986]. Однако, важным и неисследованным аспектом практического применения таких веществ является отсутствие сведений о скорости эмиссии хлора и стабильности полученных растворов.

Целью настоящего исследования явилось изучение эмиссии активного хлора из N-хлорсульфонамидов натрия, иммобилизованных на сополимере стирола с дивинилбензолом в водные растворы с использованием различных активаторов аминного типа.

Материалы и методы

Нами были синтезированы иммобилизованные N-хлорсульфонамиды натрия на полимерной подложке.