

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК 576.851.252:615.849.19:616.31

© О. П. Корнійчук¹, М. А. Панас¹, А. Я. Барилляк¹, М. І. Панас², З. Я. Швидка², Я. Г. Султан³
Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького¹
Львівський обласний клінічний діагностичний центр²
Дорожня стоматологічна поліклініка ст. Львів³

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ЕФЕКТИВНОСТІ НИЗЬКОІНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ СИНЬОГО ТА ЧЕРВОНОГО СПЕКТРІВ НА STAPHYLOCOCCUS AUREUS, ВИДІЛЕНИХ З РОТОВОЇ ПОРОЖНИНИ

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ЕФЕКТИВНОСТІ НИЗЬКОІНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ СИНЬОГО ТА ЧЕРВОНОГО СПЕКТРІВ НА STAPHYLOCOCCUS AUREUS, ВИДІЛЕНИХ З РОТОВОЇ ПОРОЖНИНИ – Метою дослідження стало вивчення чутливості Staphylococcus aureus до дії низькоінтенсивного лазерного випромінювання синього та червоного спектрів, виділених з ротової порожнини. Обстежено вікову групу 25–45 років (35 осіб з карієсом зубів та пародонтитом). 29 ізолятів S.aureus (12 штамів від осіб з карієсом зубів та 17 штамів від осіб з пародонтитом) використовувалися для дослідження впливу лазерного випромінювання червоного та синього спектрів. При застосуванні низькоінтенсивного лазерного випромінювання (НІЛВ) синього спектра із довжиною хвилі 445 нм після 15 хв спостерігалась повна відсутність росту стафілококів. Застосування лазерного випромінювання червоного спектра впродовж 5 хв не було ефективним. При опроміненні протягом 30 хв кількість мікроорганізмів S.aureus, виділених від хворих при карієсі зубів, складала $(37,2 \pm 1,5)$ КУО/мл⁴ ($p < 0,001$), а при пародонтиті – $(44,0 \pm 1,7)$ КУО/мл⁴ ($p < 0,001$). При проведенні аналізу кривих росту S. aureus, виділених з каріозних порожнин, пародонтальних кишень та референтних штамів, при опроміненні НІЛВ із спектром хвилі 445 нм та 635 нм, встановлено корелятивний зв'язок між впливом лазерного променя і довжиною хвилі та тривалістю опромінення.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ СИНЕГО И КРАСНОГО СПЕКТРОВ НА STAPHYLOCOCCUS AUREUS, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РОТОВОЙ ПОЛОСТИ – Целью исследования является изучение чувствительности Staphylococcus aureus к действию низкоинтенсивного лазерного излучения синего и красного спектров, выделенных из ротовой полости. 29 изолятов S.aureus (12 штаммов при кариесе зубов и 17 штаммов при пародонтите) использовались для дальнейших исследований воздействия лазерного излучения красного и синего спектров. При применении НИЛИ синего спектра с длиной волны 445 нм после 15 мин наблюдалось полное отсутствие роста стафилококков. Применение лазерного излучения красного спектра в течение 5 мин не было эффективным. При облучении в течение 30 мин количество микроорганизмов S.aureus, выделенных от больных при кариесе зубов, составил $(37,2 \pm 1,5)$ КУО/мл⁴ ($p < 0,001$), а при пародонтите – $(44,0 \pm 1,7)$ КУО/мл⁴ ($p < 0,001$). При проведении анализа кривых роста S. aureus, выделенных из кариозных полостей, пародонтальных карманов и референтных штаммов, при облучении НИЛИ со спектром волны 445 нм и 635 нм, установлена коррелятивная связь между воздействием лазерного луча и длиной волны и длительности облучения.

COMPARATIVE ANALYSIS OF EFFICIENCY OF LOW-INTENSITY LASER RADIATION OF BLUE AND RED SPECTRA FOR STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATED FROM THE ORAL CAVITY – The aim is study the sensitivity of Staphylococcus aureus to the action of low-intensity laser radiation by blue and red

spectra, isolated from the oral cavity. 29 isolates of S.aureus (12 strains in dental caries and 17 strains in periodontitis) were used for further studies on the effects of red laser and blue spectra. When using LLLT blue light with a wavelength of 445 nm after 15 min. there was a complete absence of growth of staphylococci. Application of red laser spectrum for 5 minutes. was not effective. After irradiation for 30 min. number of microorganisms S.aureus, isolated from patients with dental caries, was $(37,2 \pm 1,5)$ CFU/ml⁴ ($p < 0,001$), and in periodontitis – $(44,0 \pm 1,7)$ CFU/ml⁴ ($p < 0,001$). When analyzing growth S. aureus, isolated from cavities, periodontal pockets and reference strains, when irradiated with LLLT 445 nm wavelength range and 635 nm, set the correlative communication of exposure to laser beam, depending on the wavelength and duration of exposure.

Ключові слова: Staphylococcus aureus, карієс зубів, пародонти, низькоінтенсивне лазерне випромінювання, довжина хвилі, експозиція.

Ключевые слова: Staphylococcus aureus, кариес зубов, пародонтит, низкоинтенсивное лазерное излучение, длина волны, экспозиция.

Key words: Staphylococcus aureus, dental caries, periodontitis, low-intensity laser radiation wavelength, exposure.

ВСТУП Одним з важливих патогенів захворювань організму людини в цілому, так і етіологічним фактором у виникненні захворювань ротової порожнини людини належить Staphylococcus aureus. Завдяки своїм властивостям, золотистий стафілокок здатний до проліферації і персистенції на слизових оболонках. З огляду на поширеність мульти- та полірезистентних штамів S.aureus (зокрема MRST) актуальним напрямком розробки лікувальних заходів є пошук альтернативних методів з можливістю місцевого застосування [1–6].

Унікальні властивості лазерного променя відкрили широкі можливості його застосування в різних галузях: стоматології, хірургії, терапії та діагностиці. Клінічні спостереження показали ефективність лазера ультрафіолетового, видимого та інфрачервоного спектрів для місцевого застосування на патологічний осередок і для дії на весь організм [7, 8].

За останні 15 років механізми дії променевої енергії багато в чому розкриті й уточнені. Вплив низькоінтенсивного лазерного випромінювання (НІЛВ) приводить до швидкого стихання гострих запальних явищ, стимулює репаративні (відновлювальні) процеси, покращує мікроциркуляцію тканин, нормалізує загальний імунітет, підвищує резистентність (стійкість) організму [9–11].

Метою дослідження було порівняльне вивчення чутливості *Staphylococcus aureus* до дії низькоінтенсивного лазерного випромінювання синього та червоного спектрів у досліді *in vitro* для оцінки перспективності їх використання при лікуванні захворювань ротової порожнини.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ Для дослідження поставленої мети було обстежено ротову порожнину 20 осіб з карієсом зубів віком 25–45 років, 25 осіб із пародонтитом та 20 осіб без ознак стоматологічного захворювання, які вперше звернулися в лікувальний заклад (до лікування).

Матеріалом для мікробіологічного дослідження слугував вміст каріозних порожнин та пародонтальних кишень. Для запобігання контамінації матеріалу мікрофлорою навколишнього середовища, збір проводили стерильним екскаватором з дотриманням правил асептики. Біологічний матеріал засівався протягом однієї години з моменту взяття матеріалу на поживні середовища: кров'яний агар, м'ясо-пептонний агар, жовтково-сольовий агар Чистовича. Посіви інкубували при 37 °C протягом 24 год.

Родову приналежність бактерій аеробної ланки визначали на основі морфологічної характеристики, культуральних властивостей та встановлення відповідних біохімічних ознак. Інтенсивність виділення досліджуваних мікроорганізмів оцінювали за двома показниками – частотою виділення та відсотковим вмістом серед інших мікроорганізмів аеробної ланки, до складу якої входили карієсогенні стрептококи, стрептококи інших груп (у тому числі ентерококи), стафілококи, коринеформні бактерії та інші мікроорганізми.

Виділено 12 штамів *S.aureus* при карієсі зубів та 17 штамів при пародонтиті, які були ідентифіковані за їх біохімічною активністю, фагочутливістю. Досліджено наявність факторів патогенності в ізолятах (активність плазмокоагулази та лецитинази). Всі виділені штами стафілокока були метицилінчутливі. Чисті культури, виділені від хворих, було використано для проведення подальших досліджень впливу лазерного випромінювання. Для контролю досліджували референтний штам *S.aureus* ATCC №25923 (F-49). Результати кількісного дослідження мікрофлори виражали в колонієутворювальних одиницях у перерахунку на 1 мл – КУО/мл [2].

Завись культури *S.aureus* із стандартом мутності 1,0 McFarland розводили до 10^{-4} КУО/мл з наступним опроміненням у логарифмічній фазі росту в стерильних планшетах об'ємом 0,1 мл лазерним променем синього та червоного спектрів при експозиції 5, 10, 15, 20 та 30 хв у неперервному статичному режимі.

Джерелом лазерного випромінювання був лазерний діодний модуль ВАКУ ВК-1502DD синього спек-

ра з довжиною хвилі 445 нм та Scorpion Dental Optima червоного спектра з довжиною хвилі 635 нм.

Після опромінення весь об'єм зависі культури (0,1 мл) пересіювали мікропіпеткою на тверде поживне середовище, розсівали шпателем і через 24 год підраховували кількість колоній та порівнювали отримані результати із контрольною групою, яку не піддавали опроміненню.

Статистичне обрахування проводили з використанням пакета прикладних програм для статистичного аналізу даних медико-біологічних досліджень "Instat" (GraphPad Software Inc., 1993). Під час статистичної обробки було отримано результати у вигляді середнього значення досліджуваного параметра (M), стандартної похибки (відхилення) досліджуваного параметра (m) та показника достовірності (p).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Згідно з даними наукових досліджень встановлено, що антибактеріальна ефективність світла залежить від довжини хвилі, експозиції, світлочутливості опромінених культур. Також було встановлено, що при застосуванні фотосенсибілізаторів та антисептиків у поєднанні з лазерним випромінюванням червоного спектра зменшується кількість колоній та посилюється антимікробна активність [12, 13]. Бактеріостатичний ефект характерний для лазерного випромінювання з діапазоном хвилі 635 нм та бактерицидний ефект синього спектра з діапазоном хвилі 445 нм без застосування фотосенсибілізаторів.

Результати визначення ефективності лазерного випромінювання червоного спектра до *S.aureus* з ротової порожнини при карієсі зубів та пародонтиті у досліді *in vitro* представлено у таблиці 1.

Згідно з отриманими даними (табл.1), встановлено, що при опроміненні лазерним променем із довжиною хвилі 635 нм спостерігають зниження кількісних показників зі збереженням властивостей стафілококів, виділених із ротової порожнини при карієсі зубів та пародонтиті. При опроміненні протягом 30 хв кількість мікроорганізмів *S.aureus*, виділених від хворих при карієсі зубів, склала $(37,2 \pm 1,5)$ КУО/мл⁴ ($p < 0,001$), а при пародонтиті – $(44,0 \pm 1,7)$ КУО/мл⁴ ($p < 0,001$). Застосування лазерного випромінювання червоного спектра впродовж 5 хв не було ефективним, оскільки цей показник склав $(67,3 \pm 1,2)$ КУО/мл⁴ ($p > 0,05$) при карієсі зубів та при пародонтиті – $(70,8 \pm 1,3)$ КУО/мл⁴ ($p > 0,05$). Інтенсивність росту референтного штаму *S.aureus* ATCC № 25923 (F-49) склала при опроміненні протягом 30 хв $(44,3 \pm 2,4)$ КУО/мл⁴ ($p < 0,001$), а при дії лазерного променя протягом 5 хв цей показник зріс до $(71,8 \pm 1,3)$ ($p > 0,05$). Для ізолятів стафілокока від осіб контрольної групи при карієсі зубів склала $(68,3 \pm 1,1)$ КУО/мл⁴, інтенсивність росту при пародон-

Таблиця 1. Інтенсивність росту *S.aureus* при різній експозиції червоного спектра опромінення КУО/мл (10^{-4})

Виділений <i>S.aureus</i>	Кількість культур	Експозиція, хв					
		0	5	10	15	20	30
Карієс зубів	12	68,3±1,1	67,3±1,2*	61,2±1,6**	51,8±1,8**	43,7±1,3**	37,2±1,5**
Пародонтит	17	73,3±1,2	70,8±1,3**	66,2±2,0**	51,9±1,6**	47,2±1,7**	44,0±1,7**
Референтний штам ATCC № 25923 (F-49)		73,3±1,8	71,8±1,3*	70,3±1,6**	66,1±2,0**	50,3±1,5**	44,3±2,4**

Примітки: 1) * – $p > 0,05$ достовірність різниці між контролем та 5 хв експозиції;

2) ** – $p < 0,001$ достовірність між контролем та 5, 10, 15, 20 та 30 хв експозиції.

титі – $(73,3 \pm 1,2)$ КУО/мл⁴ ($p > 0,05$), для референтного штаму – $(73,3 \pm 1,8)$ КУО/мл⁴ ($p > 0,05$) відповідно.

При застосуванні НІЛВ синього спектра із довжиною хвилі 445 нм (табл. 2) після 15 хв спостерігали повну відсутність росту стафілококів. При опроміненні протягом 5 хв кількість складала при карієсі зубів $(17,5 \pm 1,2)$ КУО/мл⁴ ($p < 0,001$) та при пародонтиті $(44,0 \pm 1,7)$ КУО/мл⁴ ($p < 0,001$). При опроміненні референтних штамів *S.aureus* ATCC № 25923 (F-49) протягом 5 хв мікробне число складало $(42,8 \pm 1,1)$ КУО/мл⁴ ($p < 0,001$). При експозиції лазерного променя протягом 15 хв інтенсивність росту знизилась до $(1,25 \pm 1,0)$ КУО/мл⁴ ($p < 0,001$) при карієсі зубів та до $(2,9 \pm 1,5)$ КУО/мл⁴ ($p < 0,001$) при пародонтиті. Референтний штам *S.aureus* ATCC № 25923 (F-49) склав $(2,9 \pm 1,4)$ КУО/мл⁴ ($p < 0,001$). Інтенсивність росту *S.aureus*, яко-

го не піддавали опроміненню, складала $(68,5 \pm 1,3)$ КУО/мл⁴ для штамів від осіб з карієсом зубів та штамів від осіб з пародонтитом $(73,9 \pm 1,5)$ КУО/мл⁴ ($p < 0,001$), для референтного штаму *S.aureus* ATCC № 25923 (F-49) – $(70,0 \pm 1,0)$ КУО/мл⁴ ($p < 0,001$).

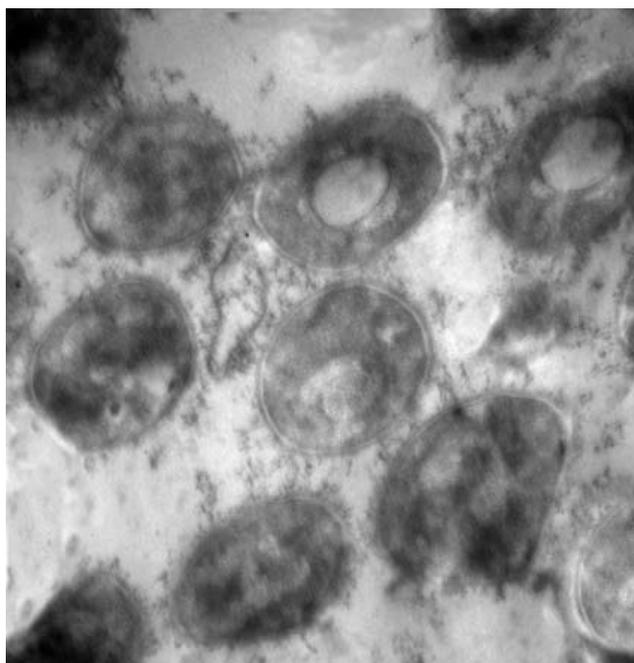
При проведенні електронно-мікроскопічного дослідження ультратонких зрізів *S.aureus* (контрольні клітини), що виростили на кров'яному агарі без застосування лазерного опромінення, встановлено (рис. 1, А), що вони мають гладку поверхню, без потовщень клітинної стінки, цитоплазматичної мембрани зі збереженням всіх структурних елементів. Після дії НІЛВ синього спектра протягом 10 хв (рис. 1, В) спостерігали потовщення та деструкцію клітинної стінки, фрагментацію внутрішньоклітинних структур та відшарування цитоплазматичної мембрани.

Таблиця 2. Інтенсивність росту *S.aureus* при різній експозиції синього спектра опромінення КУО/мл (10^{-4})

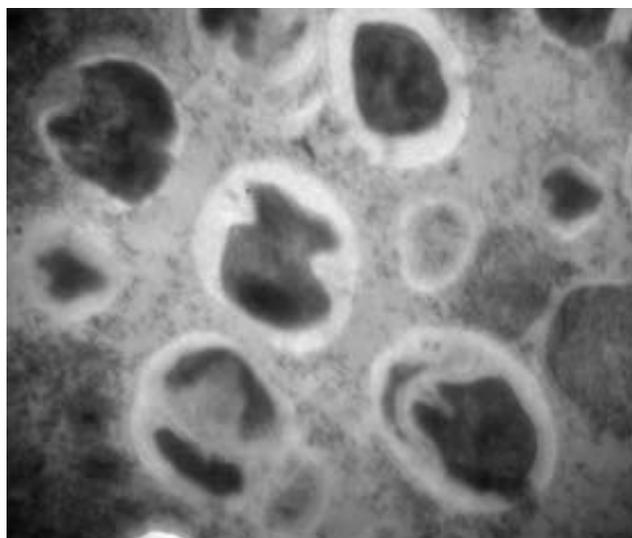
Виділений <i>S.aureus</i>	Кількість культур	Експозиція, хв					
		0	5	10	15	20	30
Карієс зубів	12	$68,5 \pm 1,3^{**}$	$17,5 \pm 1,2^{**}$	$7,1 \pm 0,8^{**}$	$1,25 \pm 1,0^{**}$	0*	0*
Пародонтит	17	$73,9 \pm 1,5^{**}$	$44,0 \pm 1,7^{**}$	$17,1 \pm 1,6^{**}$	$2,9 \pm 1,5^{**}$	0*	0*
Референтний штам ATCC № 25923 (F-49)		$70,0 \pm 1,0^{**}$	$42,8 \pm 1,1^{**}$	$17,6 \pm 1,8^{**}$	$2,9 \pm 1,4^{**}$	0*	0*

Примітки: 1) * – $p > 0,05$ достовірність між контролем та 20 та 30 хв експозиції;

2) ** – $p < 0,001$ достовірність різниці між контролем та 5, 10, 15 хв експозиції.



А



В

Рис. 1. Ультратонкий зріз клітин *Staphylococcus aureus* із збільшенням до $\times 30\ 000$:

А – без впливу НІЛВ синього спектра; В – із впливом НІЛВ синього спектра протягом 10 хв.

Отже, деструктивні процеси, що відбуваються у клітинах *S.aureus* під впливом НІЛВ синього спектра протягом 10 хв, свідчить про значне пригнічення синтезу пептидоглікану, а також про активацію ферментів автолізу, що зумовило зниження швидкості росту популяції.

ВИСНОВКИ При проведенні аналізу кривих росту *S.aureus*, виділених з каріозних порожнин, пародон-

тальних кишень та референтних штамів, при опроміненні низькоінтенсивним лазерним випромінюванням зі спектром хвилі 445 нм та 635 нм, встановлено корелятивну залежність між впливом лазерного променя і довжиною хвилі та тривалості опромінення. Характерними є відсутність росту *S. aureus* на 20 та 30 хв опромінення при використанні довжини хвилі 445 нм

та зменшення після 5 хв інтенсивності висівання, порівняно із довжиною хвилі 635 нм, при якій спостерігають лише часткове зменшення кількісних показників колоній після 30 хв опромінення. Даний ефект впливу НІЛВ вказує на його дозозалежність та спектр поглинання до виділених стафілококів.

Встановлено, що виділені *S.aureus* з пародонтальних кишень є менш чутливими до дії опромінення порівняно з взятим матеріалом із каріозних порожнин. Ефект впливу лазерного випромінювання червоного спектра на досліджені мікроорганізми проявлявся і при карієсі зубів. Бактерицидного ефекту при застосуванні лазера синього спектра досягнуто при експозиції 15 хв, разом з тим, як опромінення лазером червоного спектра потребувало більше як 30 хв експозиції. Зафіксовано відмінності у фоторезистентності культур стафілокока залежно від того, з якої екологічної ніші їх висіяно.

На підставі оцінки результатів проведених досліджень *in vitro* можна стверджувати про **перспективність** застосування лазерного випромінювання синього спектра з довжиною хвилі 445 нм для протимікробного лікування захворювань ротової порожнини та зубів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кухарская О. Г. Микробиологический баланс полости рта у больных пародонтитом / О. Г. Кухарская, М. Д. Король // Украинський стоматологічний альманах. – 2007. – № 1. – С. 58–61.
2. Микробные ассоциации пародонтального кармана у больных генерализованным пародонтитом / К. Н. Косенко, Ю. Г. Чумакова, Э. А. Городенко, С. П. Басова // Вісник стоматології. – 2000. – № 3. – С. 10–13.
3. Дмитриева Л. А. Современные представления о роли микрофлоры в патогенезе заболеваний пародонта / Л. А. Дмитриева, А. Г. Крайнова // Пародонтология. – 2004. – № 1(30). – С. 8–15.
4. Характеристика микробиоценоза пародонтальных карманов у больных хроническим генерализованным пародонтитом / Н. Б. Дорошина, Б. Я. Усвяцов, Д. Р. Кушкинбаева, В. А. Долгов // Стоматология. – 2011. – № 3. – С. 43–46.
5. 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.
6. Зорина О. А. Микробиоценоз полости рта в норме и при воспалительных заболеваниях пародонта / О. А. Зорина, А. А. Кулаков, А. И. Грудянов // Стоматология. – 2011. – № 1. – С. 73–78.
7. Зубачик В. М. Досвід застосування низькоінтенсивного лазерного випромінювання запальних захворювань пародонту та слизової оболонки порожнини рота / В. М. Зубачик, Ю.В. Сулим // Новини стоматології. – 2009. – № 1(58). – С. 45–47.
8. Nagata Yuri Juliana Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: Evaluation of the photosensitizers used and light source properties / Juliana Yuri Nagata, Noboru Hiokab, Elza Kimurac [et al.] // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2012. – № 9. – P. 122–131.
9. Yoshino Fumihiko Dental resin curing blue light induced oxidative stress with reactive oxygen species production / Fumihiko Yoshino, Ayaka Yoshida, Eizo Okada [et al.] // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2012. – № 114. – P.73–78.
10. Blue Daia Tianhong light for infectious diseases: Propionibacterium acnes, Helicobacter pylori, and beyond? / Tianhong Daia, Asheesh Gupta, Clinton K. Murray [et al.] // Drug Resistance Updates. – 2012. – № 15. – P. 223–236.
11. Feuerstein Osnat Effect of Visible Light on Porphyromonas gingivalis and Fusobacterium nucleatum: An In Vitro Study / Osnat Feuerstein, Nir Persman, Ervin I. Weiss // Phototoxic Photochemistry and Photobiology. – 2004. – № 80. – P. 412–415.
12. Sterer Nir Effect of visible light on malodour production by mixed oral microflora / Nir Sterer, Osnat Feuerstein // Journal of Medical Microbiology. – 2005. – № 54. – P. 1225–1229.
13. Guffey J. Stephen In Vitro Bactericidal Effects of 405-nm and 470-nm Blue Light / J. Stephen Guffey, Jay Wilborn // Photomedicine and Laser Surgery. – 2006. – № 24(6). – P. 684–688.

Отримано 14.03.14