УДК 576.851.48:615.849.19:036.8

М.А. ПАНАС, І.В. ТИМЧУК, О.П. КОРНІЙЧУК, М.І. ПАНАС, Х.А. КИРИК
Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького
e-mail: panas.marta@gmail.com

Вплив низькоінтенсивного лазерного випромінювання синього та червоного спектрів на штами *E. coli*

Використання світлових протимікробних чинників – альтернативний підхід у пошуках антибактеріальних засобів, який набуває актуальності зі зростанням резистентності багатьох мікроорганізмів до протимікробних препаратів [3, 6, 10]. Лазерні технології відкривають нові перспективні напрями в лікуванні захворювань ротової порожнини. Антибактеріальна дія лазерного випромінювання є важливим аспектом його багатофакторного впливу на біологічні системи. Такий ефект у комплексі з його унікальними біостимулювальними властивостями може бути використаний для селективного пригнічення патогенної мікрофлори [8].

Численні дослідження довели ефективність фотодинамічної терапії у знищенні вірусів, найпростіших, грибів, а також грампозитивних і грамнегативних бактерій [1, 5, 12].

Одним із нетипових представників мікрофлори ротової порожнини при захворюваннях зубів і пародонту є *Escherichia coli* [2].

Сприятливим тлом для розвитку карієсу зубів, особливо пародонту, та інших патологічних станів ротової порожнини є дисбіоз ротової порожнини [4, 7, 11]. Свідченням такого процесу є поява в ротовій порожнині ентеробактерій. Вони долучаються до гнильних процесів, які з'являються в разі ускладнення карієсу та інших хвороб. А тому доцільно дослідити вплив лазерного випромінювання на ешерихіях – типових представниках грамнегативної мікрофлори.

Мета дослідження – оцінити вплив низькоінтенсивного лазерного випромінювання (НІЛВ) синього та червоного спектрів на клінічні штами *E. coli*.

Матеріали і методи дослідження. Досліджували 10 штамів *E. coli*, виділених із ротової порожнини у пацієнтів 46–58 років із карієсом зубів та пародонтитом.

Матеріалом для мікробіологічного дослідження слугував уміст пародонтальних кишень та каріозних порожнин. Щоб уникнути контамінації матеріалу мікрофлорою навколишнього середовища, матеріал брали стерильним екскаватором із дотриманням правил асептики. Біологічний субстрат засівали впродовж години від часу взяття матеріалу на середовище Ендо, яке інкубували при 37 °С протягом 24 год. Від осіб, які страждали на карієс зубів і пародонтит, виділено 10 штамів *E. coli*.

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

Як джерело синього випромінювання використовували прилад із лазердіодним променем із довжиною хвилі $\lambda = 445$ нм із максимальною потужністю 700 мВ, експериментальний прилад ВАКУ ВК-1502DD (AixiZ, США). Джерелом червоного випромінювання слугував прилад із довжиною хвилі $\lambda = 635$ нм, максимальна потужність якого становила 25 мВ. Як джерело випромінювання червоного спектру застосовували прилад Scorpion Dental Optima (Optica Laser, Болгарія). У всіх експериментах опромінення здійснювали нерухомим променем протягом 5, 10, 15, 20 і 30 хв.

Опромінювали завись культури *E. coli* зі стандартом мутності 0,5 McFarland, яку розводили до 10^3 КУО/мл. Із кінцевого розведення забирали завись культури об'ємом 0,1 мл та вносили до лунок у стерильні планшети. Після дії НІЛВ весь об'єм зависі висівали мікропіпеткою на щільне живильне середовище, рівномірно розсівали шпателем і витримували в термостаті за температури 37°C протягом 24 год. Далі підраховували кількість колоній і порівнювали отримані результати з контрольною групою, яку не опромінювали.

Вивчаючи вплив різних спектрів лазерного випромінювання на виділені мікроорганізми в дослідженнях, розглядали такі показники: чисельність популяції, морфологія колоній та особливості росту на живильних середовищах [9].

Варіаційно-статистичне опрацювання результатів дослідження проводили на персональному комп'ютері за допомогою пакета прикладних програм для статистичного аналізу даних медико-біологічних і епідеміологічних досліджень Instat (GraphPad Software Inc., 1993).

Результати дослідження та їх обговорення. Після пересівання на тверді живильні середовища інтактних ізолятів *E. coli* підраховували їх показники росту та референтного штаму цього мікроорганізму.

Результати впливу НІЛВ червоного спектра з довжиною хвилі 635 нм на показники росту *E. coli* показано на рис. 1.

Короткотривалі сеанси опромінення зависей *E. coli* НІЛВ червоного спектра з довжиною хвилі 635 нм зумовили підвищення показників росту досліджуваних ізолятів за тривалості експозиції лазера 5 хв до 25 %. За опромінення протягом 10 хв цей рівень підвищився до 15 %, за дії лазерного променя 15 хв – до 10 % у всіх досліджуваних групах ($p < 0,001$). При цьому найбільший ріст припав на ізоляти, зависі яких опромінювали 5 хв.

Стимулювальний ефект НІЛВ червоного спектра з довжиною хвилі 635 нм не залежав від джерела походження ізолятів *E. coli* та був обернено пропорційний тривалості опромінення. Так, стимулювальний ефект лазера, досягнувши максимуму при 5-хвилинній експозиції, набув плавного низхідного тренду. 20-хвилинна експозиція НІЛВ червоного спектра майже не вплинула на ріст *E. coli* порівняно з показником росту інтактних бактерій ($p > 0,05$) у трьох досліджуваних групах.

Рис. 1. Кількісні показники росту *E. coli* після опромінення НІЛВ червоного спектра.

Ріст кишкової палички ізольованих при карієсі зубів при 30-хвилинній експозиції НІЛВ зменшився незначно порівняно з 5-хвилинним опроміненням. Так, цей рівень становив від $35,9 \pm 1 \times 10^3$ до $34,7 \pm 0,8 \times 10^3$ КУО/мл ($p > 0,05$), при парадонтиті відповідно від $35,1 \pm 1,4 \times 10^3$ до $32,5 \pm 1,2 \times 10^3$ КУО/мл ($p < 0,05$). Найпомітніше зниження росту показників *E. coli* за дії НІЛВ червоного спектра впродовж 30 хв зафіксовано при дослідженні референтного штаму від $37,7 \pm 1,3 \times 10^3$ до $34,8 \pm 1,0 \times 10^3$ КУО/мл ($p < 0,001$).

Описані вище кількісні зміни виявлено при висіванні опромінених культур, проте макроскопічно змін росту і морфологічних особливостей колоній *E. coli* (в т.ч. до опромінення) не зафіксовано.

Аналіз результатів дослідження впливу НІЛВ синього спектра із довжиною хвилі 445 нм на культуру *E. coli* показав тенденцію до стимулювання росту бактерій при 5 і 10 хв експозиції. Проте в разі збільшення часу опромінення до 15, 20 і 30 хв кількість колоній, що вирости, поступово зменшувалась.

За опромінення НІЛВ синього спектра протягом 5 хв рівень висівання *E. coli*, виділених від осіб із карієсом зубів, підвищився до $62,8 \pm 1,3 \times 10^3$ КУО/мл, при цьому без дії лазерного чинника зазначений показник становив лише $33,3 \pm 1,2 \times 10^3$ КУО/мл ($p < 0,001$). За опромінення виділених ізолятів протягом 10 хв їх кількість зменшилася до $43,6 \pm 1,3 \times 10^3$ КУО/мл. Показник росту виділених штамів протягом 15 хв експозиції у цій групі становив $26,6 \pm 1,2 \times 10^3$ КУО/мл. Зменшення кількості колоній спостерігалось при опроміненні протягом 20 хв експозиції, показник зупинився на рівні $16,9 \pm 0,9 \times 10^3$ КУО/мл з незначним падінням до $15,1 \pm 1,0 \times 10^3$ КУО/мл за зростання експозиції до 30 хв. Повного пригнічення росту виділених культур не спостерігалось протягом усіх часових діапазонів дії НІЛВ синього спектра.

За опромінення штамів *E. coli*, ізольованих від осіб із пародонтизмом, зміни характеристик росту бактерій були подібні до описаної вище групи "карієс зубів". Зокрема, при 5-хвилинній експозиції НІЛВ синього спектра кількість колоній зросла від $36,3 \pm 1,3 \times 10^3$ до $52,9 \pm 1,2 \times 10^3$ КУО/мл ($p < 0,001$). За опромінення протягом 10 хв експозиції показник росту *E. coli* зменшився до $41,4 \pm 1,4 \times 10^3$ КУО/мл і утримувався на цьому рівні при зростанні тривалості опромінення до 15 хв ($40,9 \pm 1,0 \times 10^3$ КУО/мл). За опромінення протягом 20 хв кількість пророслих колоній зменшилася до $36,5 \pm 1,1 \times 10^3$ КУО/мл, що практично дорівнювало показникам росту неопроміненої культури $36,3 \pm 1,3 \times 10^3$ КУО/мл. Дія лазера протягом 30 хв зумовила зменшення кількості колоній *E. coli* до $25,7 \pm 1,3 \times 10^3$ КУО/мл ($p < 0,001$).

Показник росту референтного штаму без впливу лазерного промення становив $(38,0 \pm 1,3)$ КУО/мл. За короткотривалого (5, 10 і 15 хв) опромінення НІЛВ синього спектра референтного штаму *E. coli* показники росту незначно відрізнялися ($p > 0,05$) від вихідних параметрів і становили відповідно $40,4 \pm 1,4 \times 10^3$ КУО/мл (5 хв експозиції), $37,7 \pm 1,3 \times 10^3$ КУО/мл (10 хв), $36,8 \pm 1,2 \times 10^3$ КУО/мл (15 хв). За опромінення виділених штамів протягом 20 і 30 хв експозиції кількість колоній становила $25,8 \pm 1,3 \times 10^3$ і $17,4 \pm 1,6 \times 10^3$ КУО/мл, що суттєво відрізняється від показників росту інтактних ізолятів ($p < 0,001$).

Результати впливу НІЛВ синього спектра з довжиною хвилі 445 нм на колонізаційні властивості *E. coli* представлені на рис. 2.

Рис. 2. Кількісні показники росту *E. coli* після опромінення НІЛВ синього спектра.

Висновки. Констатовано різний ступінь впливу лазерного опромінення з різною потужністю на досліджувані штами *E. coli*. За опромінення *E. coli* як синім, так і червоним спектрами спостерігалась стимуляція росту на 5-й хвилині, із поступовим зменшенням, але з наявним ростом за тривалішого опромінення. Збільшення КУО пояснюється фотодеградацією полісахаридів, що утворюють захисний екстрацелюлярний матрикс (біоплівку), за збереження здатності *E. coli* до росту на середовищі. Збільшення експозиції впливу НІЛВ синього спектра зумовлює руйнування мікробних клітин і втрату паличками *E. coli* здатності рости.

Низькоінтенсивне лазерне випромінювання може спричиняти як пригнічувальний, так і стимулювальний вплив на ріст бактеріальної флори за потужності променя 700 мВт. Експозиція 30 хв є оптимальною для досягнення бактеріостатичного ефекту.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Antimicrobial Photodynamic Therapy: Photodynamic Antimicrobial Effects of Malachite Green on Staphylococcus, Enterobacteriaceae, and Candida* / J.C. Junqueira, M.A. Ribeiro, R.D. Rossoni [et al.] // *Photomed. Laser Surg.* – 2010. – Vol. 28, N 1. – P. 67–72.
2. *Bayramov G.R.* Research of periodontal pathogenic and its etiological importance in the formation of different clinical forms of inflammatory periodontal diseases / G.R. Bayramov // *Clinical dentistry.* – 2010. – N 2(54). – С. 84–86.
3. *Chereda V.V.* Microflora as a factor of inflammatory of periodontal diseases / V.V. Chereda // *Ukrainian dental Almanac.* – 2007. – N 1. – С. 77–79.
4. *Convissar R.A.* The biologic rationale for the use of lasers in dentistry / R.A. Convissar // *Dent. Clin. N. Amer.* – 2004. – Vol. 48, N 4. – P. 771–794.
5. *Effect of Adjunctive Low Level Laser Therapy (LLLT) on Nonsurgical Treatment of Chronic Periodontitis* / M. Makhoul, M. M. Dahaba, J. Tuner [et al.] // *Photomed. Laser Surg.* – 2012. – Vol. 30, N 3. – P. 160–166.
6. *Effects of Low-Level Laser Therapy as an Adjunct to Standard Therapy in Acute Pericoronitis, and its Impact on Oral Health-Related Quality of Life* / U. Sezer, A. Eltas, K. Ustun [et al.] // *Photomedicine and Laser Surgery.* – 2012. – Vol. 30, N 10. – P. 592–597.
7. *Kucharska O.G.* The microbiological balance of the oral cavity in patients with periodontitis / O.G. Kucharska, M.D. Korol // *Ukrainian dental Almanac.* – 2007. – N 1. – С. 58–61.
8. *O'Neill J.F.* Oral Bacteria in Multi-Species Biofilms Can be Killed by Red Light in the Presence of Toluidine Blue / J.F. O'Neill, C.K. Hope, M. Wilson // *Lasers Surg. Med.* – 2002. – Vol. 31, N 2. – P. 86–90.
9. *Panas M.A.* Efficiency of applying low-level laser radiation against *Streptococcus salivarius* in case of hard dental tissue lesions / M. A. Panas // *The new Armenian Medical Journal.* – 2014. – Vol. 8, N 3. – P. 68–73.
10. *Raffetto N.* Lasers for initial periodontal therapy / N. Raffetto // *Dent. Clin. N. Amer.* – 2004. – Vol. 48, N 4. – P. 923–936.
11. *Redinova T.L.* Microbiological and clinical characteristics of oral cavity disbiotic status / T.L. Redinova, L.A. Ivanova, O.V. Martyusheva [et al.] // *Stomatologiya (Mosk).* – 2009. – N 6. – P. 12–18.
12. *Soukos N.S.* Photodynamic therapy in the control of oral biofilms / N.S. Soukos, J.M. Goodson // *Periodontology.* – 2011. – Vol. 55, N 1. – P. 143–166.

Стаття надійшла до редколегії 15.10.2015

Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения синего и красного спектров на штаммы *E. coli*

М.А. ПАНАС, И.В. ТИМЧУК, Е.П. КОРНИЙЧУК,
М.И. ПАНАС, К.А. КИРИК

Львовский национальный медицинский университет им. Данила Галицкого

Представлены результаты исследований низкоинтенсивного лазерного излучения с длиной волны 445 и 635 нм в различное время работы и мощности облучения на рост культур *E. coli*. В качестве объектов исследования использовано эталонный штамм *Escherichia coli* ATCC 25922 и штаммы, выделенные при пародонтите и кариесе зубов. Результаты сравнивались с контролем (необлученных) культур. Установлено, что низкоинтенсивное лазерное излучение может вызывать как угнетающее, так и стимулирующее влияние на рост бактериальной флоры при мощности луча 700 мВт. Экспозиция 30 мин является оптимальной для достижения противомикробного эффекта.

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

Estimation of influence of low-level laser radiation of blue and red spectra on strains of *E.coli*

M. PANAS, I. TYMCHUK, M. PANAS,
O. KORNIYCHUK, KH. KYRYK

Danylo Halytskyi Lviv National Medical University

Antibacterial action of laser radiation is an important aspect of its multifactorial influences upon biological systems. One of the main etiological factors of inflammatory of periodontal diseases is plaque, which consists of the numerous microorganisms that possess high pathogenicity and adhesiveness on the surface of teeth and invasiveness to tissue structures. The aim of our study was a comparative study of the sensitivity of *E. coli* to low level laser radiation of blue and red spectrums in experiments in vitro.

During the research, oral microflora was examined in 35 patients aged 46-58 years who reported to the clinical diagnosis. The material for microbiological examination was dental plaque and the content of caries cavity.

10 strains of *E.coli* were allocated from patients with dental caries and parodontitis, which were identified on the basic biochemical activity. Pure cultures isolated from patient and reference strain *E.coli* ATCC N 25922 were used for further studies on effects of red and blue spectra.

Laser light source was a laser diode module of the blue spectrum with a wavelength of 445 nm. Red laser diode module with a wavelength of 635 nm was used as red light source (exposure: 5, 10, 15, 20 and 30 min) in continuously uninterrupted static regime. After the irradiation the entire volume of the culture (0,1 ml) was passaged with a spatula and incubated at 37 °C. After 24 hours the number of colonies was counted and the results were compared with the *E.coli* of the control group that was not subjected to the exposure.

According to the results, at irradiation with a 635 nm wavelength laser beam increase of quantitative properties was observed with the preservation of characteristics in *E. coli* isolated from the oral cavity of patients with dental caries and parodontitis. The application of red laser spectrum was during 5 min influence on the bacteria growth. The measurement finding was $42.4 \pm 1.2 \times 10^3$ CFU/ml for bacteria isolated from patients with dental caries, while in material from patients with parodontitis it was $44.9 \pm 1.4 \times 10^3$ CFU/ml ($p < 0.001$), for reference strain *E.coli* it was $41.6 \pm 1.1 \times 10^3$ CFU/ml. During the irradiation for 30 min the number of *E.coli* isolated from patients with dental caries made $34.7 \pm 0.8 \times 10^3$ CFU/ml ($p > 0.05$), whereas in the material taken from patients with parodontitis the number of the specified bacteria made $32.5 \pm 1.2 \times 10^3$ CFU/ml ($p < 0.05$). In the control group the number of *E.coli* was $35.9 \pm 1.4 \times 10^3$ CFU/ml for caries and $35.1 \pm 1.4 \times 10^3$ CFU/ml ($p < 0.05$).

According to the data it was established that upon irradiation with a laser beam with a wavelength of 445 nm, an increase of quantitative indicators was achieved during the irradiation for 5 min, the intensity of microorganisms growth constituted $62.8 \pm 1.3 \times 10^3$ CFU/ml isolated from patients with dental caries, and material from patients with parodontitis was made $52.9 \pm 1.2 \times 10^3$ CFU/ml ($p < 0.001$). Differences among mean survival for the group were quite low for 30 min influence. During the irradiation the intensity of *E. coli* growth made $15.1 \pm 1.0 \times 10^3$ CFU/ml (caries) and $25.7 \pm 1.3 \times 10^3$ CFU/ml (parodontitis), respectively. The intensity of reference strain *E.coli* growth was $17.4 \pm 1.6 \times 10^3$ CFU/ml ($p < 0.001$).

The results of our study demonstrated that growth of *E.coli* isolated from carious cavities and parodontal pockets upon exposure to low-level laser radiation with a red and blue spectra. It was found that low-level laser radiation can cause both depression and stimulating influence on the growth of the bacterial isolated from patients with caries and parodontitis during the beam power of 700 mW.

Key words: low-level laser radiation, caries, parodontitis, *Escherichia coli*.