

Характеристика воздействия диодного лазера низкой мощности на тест-штаммы микроорганизмов в эксперименте *in vitro* с фотоактивируемой системой дезинфекции

Л.А. МАНУЧАРЯН, асп.
А.В. МИТРОНИН, д.м.н., проф.
Е.В. ИПОЛЛИТОВ, к.м.н., доц.
Кафедра кариесологии и эндодонтии
ГБОУ ВПО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России

Characteristic exposure laser diode at low power the test microorganism strains *in vitro* experiments with photoactivated disinfection system

L.A. MANUCHARYAN, A.V. MITRONIN, E.V. IPOLLITOV

Резюме: Кариес зубов остается одной из основных проблем стоматологии в мире. Поиски оптимального метода лечения кариозного поражения зубов продолжают за счет внедрения физико-химических технологий антибактериального воздействия на твердые ткани зубов. Среди новых средств воздействия на патогенную микрофлору можно отметить фотодинамический метод дезинфекции твердых тканей зубов. В данной статье представлены результаты лабораторного исследования воздействия диодного лазера Lazurit на тест-штаммы микроорганизмов.

Ключевые слова: диодный лазер, кариес зубов, фотоактивируемая система Lazurit, патогенная микробная флора.

Abstract: Dental caries remains one of the major problems in the world of dentistry. Searches for an optimal treatment of caries teeth continue through the introduction of the physico-chemical technologies antibacterial effects on hard tissues of the teeth. Among the new means of influencing the pathogens mentioned photodynamic is infection method of hard dental tissues. This article presents the results of laboratory studies of the effect of the diode laser Lazurit the test strains of microorganisms.

Key words: diode laser, dental caries, photoactivated system Lazurit, pathogenic microbial flora.

Введение

В настоящее время по-прежнему актуальна проблема медикаментозного лечения кариеса зубов и его осложнений, и не исчезла актуальность разработок новых методов диагностики и лечения данной патологии, так как результаты профилактики кариеса далеки от оптимальных [2-4, 9]. На пульпу зуба действует целый комплекс неблагоприятных факторов: механическая травма твердых тканей зуба, температурное раздражение, создающее деструктивные изменения в пульпе зуба [1, 5].

Но наибольшую роль в причине развития кариеса зубов, в том числе его рецидивов после лечения, отводится бактериальной флоре [6, 7, 10]. В связи с вышеизложенным настоящее исследование, основанное на оценке эффективности воздействия фотоактивируемой системы Lazurit на кариесогенную микробную флору, является актуальным и позволит повысить эффективность лечения кариеса зубов [8].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение эффективности дезинфицирующего воздействия фотоактивируемой системы Lazurit на микробную флору в эксперименте *in vitro*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для проведения эксперимента использовалась фотоактивируемая система Lazurit. В описываемой системе в качестве фотоактивируемого вещества используется толония хлорид в виде водного раствора низкой концентрации. Активация осуществляется с помощью диодного лазера с длиной волны 635 нм. Обработка проводится путем подачи излучения лазера, имеющего оптимизированную для активации жидкости Lazurit-L (раствор толония хлорида) длину волны, на специально разработанную насадку накопника, излучающую свет равномерно во всех направлениях (рис. 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения воздействия облучения лазера низкой мощности на представителей микробной флоры, после их предварительной обработки фотоактивируемой системой Lazurit, мы проводили оценку выживаемости различных штаммов анаэробных бактерий и грибов *Candida albicans*. При оценке воздействия лазерного облучения на бактериальные культуры использовали как факультативно-анаэробные (*Str. san-*

guinis, E. faecium), так и облигатно-анаэробные виды, относящиеся к группе пародонтопатогенных (P. intermedia, F. nucleatum).

При проведении эксперимента *in vitro* оценивали влияние продолжительности воздействия лазером с длиной волны 635 нм на тонкослойную взвесь исследуемых тест-штаммов в физиологическом растворе.

Первая серия экспериментов включала изучение действия лазера на тест-штаммы факультативно-анаэробных кокков (*Str. sanguinis*, *E. faecium*), которые в разных исследованиях обычно используются в качестве стандарта (Методические рекомендации НИИ дезинфектологии, 1987).

Str. sanguinis брали в исходной концентрации 10^5 КОЕ/мл. Таким образом, в логарифмическом выражении микробное число составляло 5,0.

На протяжении 40 сек. проведения эксперимента при контрольных посевах каждую минуту отмечали постепенное нарастающее угнетающее действие лазера на формирование колоний, причем выявлялось два наиболее четких минимума – на 26-28 сек. и 34-36 сек. с момента начала облучения. В первом случае логарифм микробного числа падал до $4,40 \pm 0,02$ во втором – до $4,30 \pm 0,05$ ($P < 0,05$ по сравнению с контролем). В процентном выражении выживаемость микробных клеток снижалась приблизительно на 10%.

Кроме того, на 30-32 сек. с момента начала облучения отмечали эффект стимуляции размножения микробов, выразившийся в увеличении числа колоний, выделенных из исследуемой взвеси. Логарифм микробного числа составил $4,80 \pm 0,04$, то есть был выше контрольного значения на 3%. Однако значение P оказалось больше 0,05.

Второй тест-штамм – *E. faecium* – использовали в исходной концентрации 10^5 КОЕ/мл. Таким образом, в логарифмическом выражении микробное число составляло 5,0.

Контрольные высевы в динамике показали, что выживаемость микробных клеток энтерококка, судя по числу выросших колоний, существенно варьировала в зависимости от продолжительности облучения в пределах наблюдения до 40 сек. проведения эксперимента. Как и в случае с предыдущим штаммом, превалировало угнетающее действие лазера на формирование колоний. Причем наблюдалось два основных минимума: наиболее выраженное угнетение размножения бактерий отмечено на 26-28 сек. с момента начала облучения – $4,00 \pm 0,03$ ($P < 0,05$), менее выраженное – на 34-36 сек. ($4,40 \pm 0,03$). В процентном выражении выживаемость микробных клеток снижалась на 13% и 5% соответственно.

Кроме того, на 30-32 и 38-42 сек. с момента начала облучения отмечали эффект стимуляции размножения микробов, выразившийся в увеличении числа колоний, выделенных из исследуемой взвеси. Логарифм микробного числа составил $4,70 \pm 0,03$ для первого максимума, и $4,70 \pm 0,03$ – для второго, то есть был выше контрольного значения не более чем на 1,7%.

Вторая серия экспериментов проведена с двумя штаммами облигатно-анаэробных бактерий, выделенных от больных хроническим пародонтитом в стадии обострения.

Установлено, что для тест-штамм *Prevotella intermedia*, взятого в исходной концентрации 10^5 КОЕ/мл, что в логарифмическом выражении составляло 5,0, на протяжении 40 сек. проведения эксперимента продемонстрировал преимущественно угнетающее дей-

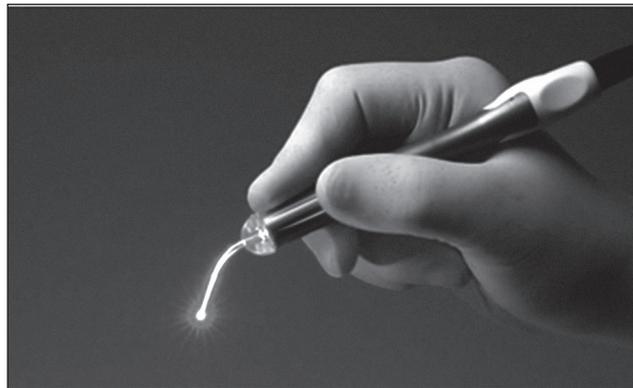


Рис. 1. Диодный лазер

ствие лазера на формирование колоний, причем выявлялось два наиболее четких минимума – на 38 сек. и 36-38 сек. с момента начала облучения. В первом случае логарифм микробного числа падал до $4,40 \pm 0,04$ во втором – до $4,50 \pm 0,04$ ($P < 0,05$ по сравнению с контролем). В первом случае выживаемость микробных клеток в процентном выражении снижалась приблизительно на 5%.

Кроме того, на 32-34 сек. с момента начала облучения отмечали максимум числа колоний, выделенных из исследуемой взвеси. Логарифм микробного числа составил $4,50 \pm 0,05$, то есть был ниже контрольного значения. Второй максимум наблюдали на 42-44 сек. – кривая достигала уровня контроля, но не превышала его, как это было зарегистрировано со штаммами грамположительных кокков.

Другой клинический штамм – *F. Nucleatum*, использовали в исходной концентрации 10^5 КОЕ/мл. Таким образом, в логарифмическом выражении микробное число составляло 5,0.

Выживаемость микробных клеток фузобактерий, судя по числу выросших колоний, также варьировала в зависимости от продолжительности облучения в пределах наблюдения до 40 сек. проведения эксперимента. При этом первый минимум отмечали на 26-30 сек. эксперимента ($3,80 \pm 0,05$), а второй был зафиксирован позже, чем в экспериментах с прочими штаммами. Он наблюдался на 42-44 сек. и был более выраженным ($3,75 \pm 0,02$, $P < 0,05$). В процентном выражении выживаемость микробных клеток снижалась приблизительно на 5%.

Эффект достоверной стимуляции размножения микробов, также как и в случае с предыдущим видом, не отмечали, хотя два максимума числа колоний, выделенных из исследуемой взвеси, все-таки были – в первые 24 сек. облучения и на 34-36 сек. Логарифм микробного числа составил $4,00 \pm 0,03$ как для первого, так и для второго максимума, то есть в обоих случаях статистически не отличался от контрольного значения.

Третий эксперимент был проведен с моделью эукариотических клеток – грибами рода *Candida*. Штамм *Candida albicans* был использован в концентрации 10^5 КОЕ/мл, что в логарифмическом выражении составляло 5,0. При анализе выживаемости для тест-штамма *Candida albicans* отмечали некоторое смещение минимумов, которые были характерны для бактерий. Первый минимум наблюдали на 14 сек. ($4,40 \pm 0,03$), а второй, более значительный, отмечали на 32-34 сек. облучения. Он составлял $4,20 \pm 0,04$ ($P < 0,05$ по сравнению с контролем). В процентном выражении – приблизительно на 12%.

Таблица 1. Сравнительная характеристика средних величин максимальных и минимальных значений числа колоний, выделенных из взвеси тест-штаммов микроорганизмов, после воздействия диодным лазером низкой мощности с длиной волны 635нм (lgN в мл)

Тест-штаммы	Контроль	Минимум	P	Максимум	P
Str. sanguinis	5,00 ± 0,02	4,40 ± 0,02	<0,05	4,80 ± 0,02	>0,05
E. faecium	5,00 ± 0,02	4,00 ± 0,03	<0,05	4,70 ± 0,03	>0,05
P. intermedia	5,00 ± 0,02	4,40 ± 0,04	<0,05	4,50 ± 0,04	<0,05
F. nucleatum	5,00 ± 0,02	3,80 ± 0,02	<0,05	4,00 ± 0,04	<0,05
C.albicans	5,00 ± 0,02	4,20 ± 0,04	<0,05	4,60 ± 0,03	>0,05

Разница между контрольными и экспериментальными данными достоверна при $P < 0,05$

Кроме того, на 28-30 сек. с момента начала облучения отмечали максимум числа колоний, выделенных из исследуемой взвеси. Логарифм микробного числа составил $4,60 \pm 0,05$, то есть был ниже контрольного значения. Второй максимум наблюдали на 42-44 сек. – кривая достигала уровня контроля, но не превышала его, как это было зарегистрировано в случае с тест-штаммами бактерий.

Следовательно, максимумы выживаемости клеток кандиды, наблюдали на 28-30 сек. и 42-44 сек. облучения, однако ни в одном случае значения кривой выживаемости не превышали уровень контроля. Как и в случае с облигатно-анаэробными штаммами, наблюдали исключительно угнетающее действие облучения на объект исследования.

Представленный анализ кривых выживания тест-штаммов различных микроорганизмов – бактерий и грибов – позволяет сделать несколько принципиальных обобщений. Прежде всего, ингибирующее действие лазера с длиной волны 635 нм различно в отношении прокариотических (бактерии) и эукариотических клеток (грибы). Характерный минимум регистрируется в интервале 26-28 сек. в отношении всех исследованных бактериальных культур и 32-34 сек. – в отношении эукариотических клеток кандиды (табл. 1).

Таким образом, воздействие диодного лазера низкой мощности на представителей микрофлоры приводит к уменьшению числа бактерий и снижает размножение.

Вместе с тем, следует отметить, что выявленное снижение выживаемости бактерий было весьма незначительным (хотя и достоверным) и составляло от 5% до 13% в зависимости от вида микроба. Что касается максимальных значений выживаемости, то ни в одном эксперименте выявленные тенденции к стимуляции размножения (выше контроля) не были подтверждены статистически.

Заслуживает внимания тот факт, что эукариотические клетки кандиды (возможно, также и эпителии полости рта) в этом временном интервале оказались максимально сохранены. С другой стороны, весьма незначительное угнетение размножения бактерий под действием лазерного облучения (5-13%), на наш взгляд, делает клиническое значение данного феномена дискуссионным и требует дальнейших исследований.

Поступила 14.02.2014

Координаты для связи с авторами:
127006, г. Москва, ул. Долгоруковская, д. 4
Клинико-диагностический центр

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Боровский Е. В. Кариес зубов: препарирование и пломбирование. – М.: АО «Стоматология», 2001. – 144 с.
Borovskiy E. V. Karies zubov: preparirovanie i plombirovanie. – М.: АО «Стоматология», 2001. – 144 с.
- Воронина К. Ю., Митронин А. В., Ульянова Т. В. Клиническая оценка пломбировочных материалов, применяемых для устранения дефектов твердых тканей корневых зубов // Эндодонтия today. 2009. №2. С. 56-60.
Voronina K. Ju., Mitronin A. V., Ul'janova T. V. Klinicheskaja ocenka plombirovochnyh materialov, primenjaemyh dlja ustraneniya defektov tverdyh tkanej kornej zubov // Endodontijatoday. 2009. №2. S. 56-60.
- Применение световых факторов в лечении зубов / А.А. Кунин, И.А. Беленова, О.И. Олейник, А.В. Сущенко, О.А. Кудрявцев // Семейное здоровье в XXI веке: тезисы XII международной научной конференции 27 апреля–9 мая 2009 года. – Далан: ПОНИЦАА, 2005. – С. 190-191.
Primenenie svetovyh faktorov v lechenii zubov / A.A. Kunin, I.A. Belenova, O.I. Olejnik, A.V. Sushhenko, O.A. Kudrjavcev // Semejnoe zdorov'e v XXI veke: tezisy XII mezhdunarodnoj nauchnoj konferencii 27 aprlja–9 maja 2009 goda. – Dalan: PONICAA, 2005. – С. 190-191.
- Кунин А. А., Васильева Л. В., Панкова С. Н., Кунин В. А. и др. Лазеротерапия стоматологических заболеваний: учеб.-метод. пособ. – Воронеж, 2008. – 99 с.
Kunin A. A., Vasil'ev L. V., Pankova S. N., Kunin V. A. i dr. Lazeroterapija stomatologicheskikh zabolevanij: ucheb.-metod. posob. – Voronezh, 2008. – 99 с.
- Терапевтическая стоматология. Кариесология и заболевания твердых тканей зубов. Эндодонтия. Руководство к практическим

занятиям / Ю.М. Максимовский, А.В. Митронин под общ. ред. Ю.М. Максимовского. – ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 480 с.; М.: Медицина, 2002. – 640 с.

Terapevтиcheskaja stomatologija. Kariesologija i zabolevanija tverdyh tkanej zubov. Endodontija. Rukovodstvo k prakticheskim zanjatijam / Ju.M. Maksimovskij, A.V. Mitronin pod obshch. red. Ju.M. Maksimovskogo. – GEOTAR-Media, 2014. – 480 s.; M.: Medicina, 2002. – 640 s.

6. Царев В. Н., Митронин А. В., Малахов А. В. Определение чувствительности тест культур бактерий к прокладочному материалу, содержащему ионы серебра / Юбилейный сб. научн. работ «Преемственность поколений – основа развития неврологии». – М.: ГОУ ВПО «МГМСУ», 2008. – С. 187-191.

Carev V. N., Mitronin A. V., Malahov A. V. Opredelenie chuvstvitel'nosti test kul'tur bakterij k prokladochnomu materialu, soderzhashemu iony serebra / Jubilejnyj sb. nauchn. rabot «Priemstvennost' pokolenij – osnova razvitija nevrologii». – М.: GOU VPO «MGMSU», 2008. – С. 187-191.

7. Tanzer J. M. Salivary and plaque microbiological tests and the management of dental caries // J. Dent. Educ. 1997. Vol. 61. №11. P. 866-875.

8. Maisch T, Bosl C., Szeimies R.M., Lehn N., Abels C. Antibacterial photodynamic therapy. A new treatment for bacterial skin diseases? // Hautarzt. 2005. Vol. 56. №11. P. 1048-1055.

9. Hicks M. J., Flaitz C. M. Epidemiology of dental caries in the pediatric and adolescent population: a review of past and current trends // J. Clin. Pediatric Dent. 1993. Vol. 18 (1). P. 43-49.

10. Axelsson P. Diagnosis and risk prediction of dental caries. – Quintessence Publishing Co. Inc., 2000. – 307 p.