

Пантьо Валерій Валерійович,

кандидат біологічних наук, доцент,
доцент кафедри мікробіології, вірусології, епідеміології
з курсом інфекційних хвороб,
ДВНЗ «Ужгородський національний університет»
ORCID ID: 0000-0002-0207-3372
м. Ужгород, Україна

Данко Ельвіра Михайлівна,

старший викладач кафедри терапевтичної стоматології,
ДВНЗ «Ужгородський національний університет»
ORCID ID: 0000-0002-3997-9311
м. Ужгород, Україна

Костенко Євген Якович,

доктор медичних наук, професор,
професор кафедри ортопедичної стоматології,
ДВНЗ «Ужгородський національний університет»
ORCID ID: 0000-0002-3997-2371
м. Ужгород, Україна

Пантьо Валерій Іванович,

кандидат медичних наук, доцент,
доцент кафедри загальної хірургії
ДВНЗ «Ужгородський національний університет»
ORCID ID: 0000-0003-2137-1567
м. Ужгород, Україна

Коваль Галина Миколаївна,

доктор медичних наук, професор
завідувач кафедри мікробіології, вірусології,
епідеміології з курсом інфекційних хвороб
ДВНЗ «Ужгородський національний університет»
ORCID ID: 0000-0003-4391-2950
м. Ужгород, Україна

Протимікробна активність метиленового синього та світлодіодного випромінювання в умовах *in vitro* та *in vivo*

Вступ. Антибіотики відіграють ключову роль у лікуванні та контролі бактеріальних інфекцій. Виникнення та розповсюдження резистентності до протимікробних засобів підвищує важкість перебігу хвороб, збільшує рівень смертності та зумовлює значні економічні збитки. Одним зі шляхів подолання даної глобальної проблеми є використання фотохімічних методів, зокрема антимікробної фотодинамічної терапії.

Мета дослідження – визначити сумісний вплив фотосенсибілізатора метиленового синього та світлодіодного випромінювання червоного спектру на мікроорганізми, виділені від хворих на хронічний генералізований пародонтит в експериментальних та експериментально-клінічних дослідженнях.

Матеріали та методи. Вивчено сумісний вплив 0,1% водного розчину метиленового синього та світлодіодного випромінювання червоно-інфрачервоного діапазону на інтенсивність росту *Streptococcus mutans* в умовах *in vitro*, а також дію вказаних факторів на мікрофлору пародонтальних кишень хворих на хронічний генералізований пародонтит.

Результати досліджень та їх обговорення. Встановлено, що комплексний вплив фотосенсибілізатора та низькоінтенсивного випромінювання зумовлює суттєвий протимікробний ефект щодо досліджуваного штаму, який значно перевищує ефект впливу даних чинників окремо. Відзначали бактерицидний ефект на мікрофлору пародонтальних кишень при використанні запропонованої методики в клініко-експериментальних дослідженнях.

Висновки. Враховуючи ряд переваг використання фотодинамічної терапії – активність щодо широкого кола патогенів, можливість проведення процедур у важкодоступних місцях, малу інвазивність, відсутність побічних ефектів, даний метод може бути використаний при лікуванні хронічного генералізованого пародонтиту та інших патологій ротової порожнини, зумовлених патогенними та умовно-патогенними мікроорганізмами.

Ключові слова: низькоінтенсивне випромінювання, *Streptococcus mutans*, хронічний генералізований пародонтит, антимікробна фотодинамічна терапія.

Pantyo Valeriy Valeriiovych, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Associate Professor at the Department of Microbiology, Virology, Epidemiology with the Course of Infectious Diseases, Uzhhorod National University, ORCID ID: 0000-0002-0207-3372, Uzhhorod, Ukraine

Danko Elvira Mykhailivna, Senior Lecturer at the Department of Therapeutic Dentistry, Uzhhorod National University, ORCID ID: 0000-0002-3997-9311, Uzhhorod, Ukraine

Kostenko Yevhen Yakovich, Doctor of Medical Sciences, Professor, Professor at the Department of Prosthetic Dentistry, Uzhhorod National University, ORCID ID: 0000-0002-3997-2371, Uzhhorod, Ukraine

Pantyo Valeriy Ivanovych, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Associate Professor at the Department of General Surgery, Uzhhorod National University, ORCID ID: 0000-0003-2137-1567, Uzhhorod, Ukraine

Koval Galyna Mykolaivna, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Microbiology, Virology, Epidemiology with the Course of Infectious Diseases, Uzhhorod National University, ORCID ID: 0000-0003-4391-2950, Uzhhorod, Ukraine

Antimicrobial activity of methylene blue and LED radiation *in vitro* and *in vivo*

Introduction. Antibiotics play a key role in the treatment and control of bacterial infections. The emergence and spread of antimicrobial resistance increases the morbidity and mortality rate of diseases and causes significant economic losses. One of the ways to overcome this global problem is the use of photochemical methods, in particular antimicrobial photodynamic therapy.

The purpose of the work was to determine the combined effect of methylene blue photosensitizer and red spectrum LED radiation on microorganisms isolated from patients with chronic generalized periodontitis in experimental and experimental-clinical studies.

Materials and methods. The combined effect of a 0.1% aqueous solution of methylene blue and LED radiation of the red-infrared range on the growth intensity of *Streptococcus mutans in vitro*, as well as the effect of these factors on the microbiome of the periodontal pockets of patients with chronic generalized periodontitis, was studied.

Results and discussion. It was established that the combined effect of the photosensitizer and low-intensity radiation causes a significant antimicrobial effect on the studied strain, which significantly exceeds the effect of the impact of these factors separately. A bactericidal effect on periodontal pockets microflora was noted when using the proposed method in clinical studies.

Conclusions. Taking into account several advantages of using photodynamic therapy – activity against a wide range of pathogens, the possibility of carrying out procedures in hard-to-reach places, low invasiveness, and the absence of side effects, this method can be used in the treatment of chronic generalized periodontitis and other pathologies of the oral cavity caused by pathogenic and opportunistic microorganisms.

Key words: low-intensity radiation, *Streptococcus mutans*, chronic generalized periodontitis, antimicrobial photodynamic therapy.

Вступ. Відкриття антибіотиків – одне з найбільш вагомих досягнень науки, а їх терапевтичне застосування є справжнім дивом в історії медицини [1, 2]. Разом з тим, розвиток резистентності до протимікробних засобів є природним та невідворотним процесом. На сьогоднішній день стійкість до антибіотиків, які широко використовують у медичній практиці є невіршеною глобальною проблемою в галузі охорони здоров'я та однією з найбільших загроз XXI століття [3, 4, 5].

Поширення стійкості погіршило результати лікування, зокрема хронічного генералізованого пародонтиту. При пародонтиті руйнуються зв'язки між опорною тканиною зуба (тканиною пародонта) і зубом, і це створює основу для появи пародонтальних кишень, в яких може виживати широкий спектр пародонтальних патогенів [6]. Внаслідок стійкості мікроорганізмів до антибіотиків та відсутності доступу до глибших ділянок пародонтальної кишені, традиційна терапія пародонтиту, яка включає в себе зняття зубних відкладень та використання медикаментозного лікування з протимікробними засобами не завжди приносить бажаний результат [7, 8].

Серед численних шляхів боротьби зі стійкими мікроорганізмами, можна виділити три основні підходи: розробка нових антибіотиків або вдосконалення відомих антибактеріальних засобів [9], синтез нових хімічних сполук з антимікробними властивостями [10, 11, 12] та деякі альтернативні методи, зокрема використання бактеріофагів [13] та фотохімічних методів [14, 15, 16].

Один з напрямків, які розвиваються найбільш динамічно є антимікробна фотодинамічна терапія (аФДТ). Даний метод полягає у використанні фотосенсибілізатора (ФС) з подальшим опроміненням низькоінтенсивним випромінюванням відповідної довжини хвилі. Це запускає фотодинамічну реакцію, що призводить до утворення активних форм кисню [15, 16, 17]. Основними перевагами аФДТ є ефективна дія як на Грампозитивні, так і на Грам-негативні мікроорганізми, а також гриби, найпростіші та віруси, мала інвазивність та відсутність індукування резистентних штамів [18].

Незважаючи на достатньо значну кількість наукових праць присвячених дослідженню механізмів аФДТ [15-18], ряд питань щодо механізмів біологічної дії залишаються відкритими. Зокрема не до кінця зрозумілим є ступінь впливу таких параметрів випромінювання як поляризація та когерентність на різні властивості мікроорганізмів. Тому актуальним є дослідження впливу різних джерел низькоінтенсивного випромінювання на біологічні об'єкти, а також їх поєднаний вплив з ФС при фотодинамічній терапії.

Мета роботи – дослідити сумісний вплив фотосенсибілізатора метиленового синього та світлодіодного випромінювання червоного спектру на мікроорганізми, виділені від хворих на хронічний генералізований пародонтит в умовах *in vitro* та *in vivo*.

Методологія та методи дослідження. Досліджено комплексний вплив ФС 0,1 % водного розчину метиленового синього та світлодіодного випромінювання червоно-інфрачервоного спектру на інтенсивність росту *Streptococcus mutans*, виділеного від хворого на

генералізований пародонтит, який проходив лікування в Університетській стоматологічній поліклініці. Первинний посів проводили на кров'яний агар (КА). Далі досліджували колонії, які давали α гемоліз бактеріоскопічним та бактеріологічним методами. Для остаточного діагнозу використовували тест-систему СТРЕПТОтест 16 («PLIVA-Lachema a.s.», Чеська республіка).

Для дослідження впливу ФС та низькоінтенсивного випромінювання *in vitro* брали добову культуру досліджуваного штаму та з допомогою денситометра (DEN-1, Biosan, Латвія, 2016) стандартизували в рідкому поживному середовищі до стандарту мутності 0,5 за Мак-Фарландом. Отриманий інокулом додатково розводили в $1,25 \times 10^5$ разів. Після цього мікроорганізми ділили на 4 групи. 1-у – контрольну групу пересівали на щільне поживне середовище КА у чашки Петрі. Мікроорганізми 2-ої групи опромінювали світлодіодним випромінюванням червоно-інфрачервоного спектру при експозиції 10 хвилин та частотою 8000 Гц. До інокуляму мікроорганізмів 3-ої групи додавали ФС метиленовий синій у співвідношенні 1:10, витримували у темряві 20 хвилин та пересівали на чашки Петрі з КА. До інокуляму 4-ої групи додавали метиленовий синій (у аналогічному співвідношенні з 3-ою групою) та після 20-хвилинної темної фази опромінювали світлодіодним випромінюванням (аналогічними з 2-ою групою параметрами).

Враховуючи швидкі темпи росту та розмноження мікроорганізмів у рідких середовищах, пересів інокуляму різних груп проводили одночасно. При цьому об'єм інокуляму, який пересівали на чашки з КА був однаковим для всіх досліджуваних груп та становив 200 мкл. Методика формування груп мікроорганізмів та проведення досліджень аналогічна описаним в літературних джерелах [19], а також раніше опублікованим власним дослідженням з іншими видами умовно-патогенних мікроорганізмів [15].

Після пересіву мікробного інокуляму на чашки Петрі, останні інкубували в термостаті при 37 °C протягом 24 годин. Після цього інтенсивність росту визначали підрахунком кількості колоній мікроорганізмів. Усі серії досліджень проводили 5-кратно. Отримані дані статистично обробляли: визначали середнє арифметичне та стандартне відхилення вибірок. Для встановлення достовірності різниці між експериментальними групами та контролем вираховували t-критерій Стьюдента, користуючись комп'ютерною програмою Statistica 10.0.

Для дослідження впливу ФС та світлодіодного випромінювання *in vivo* у пародонтальні кишені хворих (n=5) на хронічний генералізований пародонтит вносили 0,1 % розчин метиленового синього, протягом 20 хв витримували темнову фазу. Далі проводили опромінення ураженої ділянки ясен світлодіодним випромінюванням з відстані 2-5 см та експозицією 10 хвилин (рис. 1).

Забір мікрофлори з пародонтальних кишень пацієнтів проводили стерильним одноразовим тампоном та вносили на транспортне середовище до опромінення, після темної фази та після опромінення з подальшим пересівом на чашки Петрі з КА.



Рис. 1. Опромінення ділянки ясен світлодіодним випромінюванням

Джерело світлодіодного випромінювання – прилад Medolight-Red (Biopton light therapy system by Zepher Group, Швейцарія), який генерує світлодіодне випромінювання червоно-інфрачервоного діапазону ($\lambda=640 \pm 30$ та 880 ± 30) зі щільністю потужності $5,35 \text{ мВт/см}^2$ (з відстані 0-1 см). Вибір джерела випромінювання обумовлений, зокрема піком поглинання метиленового синього у червоному діапазоні спектра ($\lambda=664 \text{ нм}$) [20].

Виклад основного матеріалу дослідження. Встановлено, що опромінення низькоінтенсивним світлодіодним випромінюванням, додавання ФС 0,1 % водного розчину метиленового синього, а також комплексний вплив вказаних факторів суттєво впливають на інтенсивність досліджуваного штаму *S. mutans* (рис. 2).

Як видно з рис. 2, у контрольній групі відзначали майже суцільний ріст на чашці Петрі, через що неможливо було провести підрахунок кількості мікробних колоній. Також частково суцільно росли мікроорганізми 2-ої групи, які були опромінені світлодіодним випромінюванням, хоча слід відзначити дещо меншу інтенсивність росту, порівняно з контролем. Метиленовий синій суттєво інгібував ріст досліджуваного штаму *S. mutans*, а кількість мікробних колоній на чашках Петрі становила в середньому $88,4 \pm 14,7$. Найбільш суттєвий протимікробний вплив відзначали при додаванні ФС з подальшим опроміненням мікроорганізмів 4-ої групи. Середня кількість мікробних колоній на чашках Петрі при цьому становила $10,6 \pm 8,7$. У окремих серіях фотодинамічний вплив повністю пригнічував ріст досліджуваних мікроорганізмів 4-ої групи, що зокрема демонструє рис. 2. Таким чином, інтенсивність росту мікроорганізмів 4-ої групи була на 88 % нижчою, порівняно з 3-ою групою ($p < 0,0001$).

Результати протимікробної активності аФДТ на мікрофлору пародонтальних кишень хворих на хронічний генералізований пародонтит представлені на рис. 3.

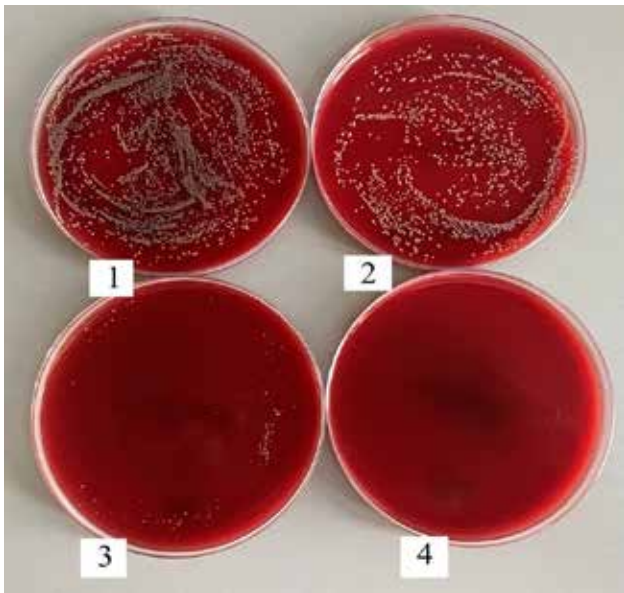


Рис. 2. Ріст *S. mutans* на чашках Петрі з кров'яним агаром 1 – контрольна група; 2 – опромінення світлодіодним випромінюванням 3 – додавання метиленового синього; 4 – метиленовий синій + опромінення

В умовах *in vivo* протимікробна активність ФС метиленового синього виявилася нижчою, порівняно з експериментальними серіями *in vitro*. Хоча у переважній більшості випадків при візуальній оцінці росту мікроорганізмів на чашках Петрі з КА спостерігали дещо нижчу інтенсивність росту порівняно з контролем, вираженого бактерицидного ефекту не відзначали. Комплексний вплив ФС з подальшим опроміненням світлодіодним випромінюванням червоного спектру проявив високу активність як в експериментальних, так і клініко-експериментальних дослідженнях.

У зв'язку з суцільним ростом висіяних зразків як до процедури, так і в серіях з додаванням ФС після темної фази, кількісне порівняння мікробних колоній не проводили. Середня кількість колоній при посіві на чашки Петрі матеріалу взятого після проведення ФДТ становила $22,8 \pm 9,4$.

Літературні дані [15, 17, 21] свідчать, що анаеробні мікроорганізми значно більш чутливі до аФДТ, порівняно з аеробними та факультативно анаеробними. Це пояснюється відсутністю в анаеробів ферментів антиоксидантної системи, які утилізують реактивні форми



Рис. 3. Ріст мікроорганізмів, висіяних із пародонтальних кишень хворих. 1 – до проведення процедури; 2 – після внесення ФС та 20-хвилинної темної фази; 3 – після проведення аФДТ

кисню, зокрема супероксиданіон, гідроксил аніон та пероксид водню. Враховуючи, що абсолютна більшість пародонтопатогенних мікроорганізмів є анаеробними [22], використання аФДТ є ефективним методом санації пародонтальних кишень у хворих на пародонтит. Перспективність даного методу обумовлена також рядом переваг аФДТ, зокрема відсутністю виражених протипоказів.

Висновки з дослідження. Комплексний вплив фотосенсибілізатора 0,1 % водного розчину метиленового синього та світлодіодного випромінювання червоно-інфрачервоного спектру проявляє суттєву протимікробну активність щодо досліджуваного штаму *Streptococcus mutans* в експериментальних дослідженнях, а також при клініко-експериментальному застосуванні для санації пародонтальних кишень у хворих на хронічний генералізований пародонтит. Враховуючи ряд переваг та відсутність побічних ефектів, запропонована методика може бути рекомендована для лікування захворювань тканин пародонту та інших патологічних процесів ротової порожнини, зумовлених патогенними та умовно-патогенними мікроорганізмами.

REFERENCES

1. Uddin, TM, Chakraborty AJ, Khusro A, Zidan BRM, Mitra S, Emran TB, et al. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of infection and public health*. 2021; 14(12):1750-66. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>
2. Watkins RR, Bonomo RA. Overview: global and local impact of antibiotic resistance *Infect Dis Clin North Am*. 2016;30(2):313-22. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.001>
3. Dadgostar P. Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infection and Drug Resistance*. 2019;12:3903-10. DOI: <https://doi.org/10.2147/IDR.S234610>
4. Nwobodo DC, Ugwu MC, Anie CO, S. Al-Ouqaili MT, Ikem JC, Chigozie UV, Saki M. Antibiotic resistance: The challenges and some emerging strategies for tackling a global menace. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2022;36(9):e24655. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcla.24655>

-
5. Tang KWK, Millar BC, Moore JE. Antimicrobial resistance (AMR). *British Journal of Biomedical Science*. 2023;80:11387. DOI: <https://doi.org/10.3389/bjbs.2023.11387>
 6. Nazir M, Al-Ansari A, Al-Khalifa K, Alhareky M, Gaffar B, Almas K. Global prevalence of periodontal disease and lack of its surveillance. *Sci. World J.* 2020;1(2020):2146160. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/2146160>
 7. Berakdar M, Callaway A, Eddin MF, Ross A, Willershausen B. Comparison between scaling-root-planing (SRP) and SRP/photodynamic therapy: six-month study. *Head & face medicine*. 2012;8:1-6. DOI: <https://doi.org/10.1186/1746-160X-8-12>
 8. Mahdizade-Ari M, Pourhajibagher M, Bahador A. Changes of microbial cell survival, metabolic activity, efflux capacity, and quorum sensing ability of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* due to antimicrobial photodynamic therapy-induced bystander effects. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2019;26:287-294. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.04.021>
 9. Banin E, Hughes D, Kuipers OP. Editorial: Bacterial pathogens, antibiotics and antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. 2017; 41(3):450-2. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsre/fux016>
 10. Kut DZ, Kut M, Komarowska-Porokhnyavets O, Kurka M, Onysko M, Lubenets V. Antimicrobial activity of halogen- and chalcogen-functionalized thiazoloquinazolines. *Letters in Drug Design and Discovery*. 2024;21(13):2490-6. DOI: <https://doi.org/10.2174/1570180820666230726160348>
 11. Pantyo VV, Haleha OV, Kut DZ, Kut MM, Onysko MY, Danko EM, Koval GM, Pantyo VI, Haza KV, Bulyna TB. The effect of low-intensity laser radiation on the sensitivity of *Staphylococcus aureus* to some halogen-containing azaheterocycles. *Regul. Mech. Biosyst.* 2024;15(2):230-4. DOI: <https://doi.org/10.15421/022434>
 12. Browne K, Chakraborty S, Chen R, Willcox MD, Black DS, Walsh WR, Kumar NA, New Era of Antibiotics: The Clinical Potential of Antimicrobial Peptides. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(19):7047. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21197047>
 13. Kwiatek M, Parasion S, Nakonieczna A, Therapeutic bacteriophages as a rescue treatment for drug-resistant infections – an in vivo studies overview. *Journal of Applied Microbiology*. 2020;128(4):985-1002. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.14535>
 14. Gonçalves AS, Leitão MM, Fernandes JR, Saavedra MJ, Pereira C, Simões M, Borges A. Photodynamic activation of phytochemical-antibiotic combinations for combatting *Staphylococcus aureus* from acute wound infections. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2024;258:112978. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2024.112978>
 15. Pantyo VV, Koval GM, Danko EM, Pantyo VI. Complex impact of polarized and non-polarized low intense light and methylene blue on growth rate of some opportunistic microorganisms. *Regul. Mech. Biosyst.* 2020;11(4):520-3. DOI: <https://doi.org/10.15421/022079>
 16. Murugaiyan J, Kumar PA, Rao GS, Iskandar K, Hawser S, Hays et al. Progress in Alternative Strategies to Combat Antimicrobial Resistance: Focus on Antibiotics. *Antibiotics*. 2022;11(2):200. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020200>
 17. Piksa M, Lian C, Samuel IC, Pawlik KJ, Samuel ID, Matczyszyn K. The role of the light source in antimicrobial photodynamic therapy. *Chemical Society Reviews*. 2023;52(5):1697-22. DOI: 10.1039/D0CS01051K
 18. Polat E, Kang K. Natural Photosensitizers in Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Biomedicines*. 2021;9(6):584. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines9060584>
 19. Rolim JP, De-Melo MA, Guedes SF, Albuquerque-Filho FB, De Souza JR, Nogueira NA, Zanin CJ, Rodrigues LK. The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2012; 106:40-46. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.10.001>
 20. Pantyo VV, Danko EM, Fizer MM, Koval GM, Pantyo VI. Impact of polarized low-intense radiation and photosensitizers on growth of *Staphylococcus aureus*. *Bulletin of problems biology and medicine*. 2022;2(165):12-16. DOI: 10.29254/2077-4214-2022-2-2-165-12-16
 21. Rajesh S, Koshi E, Philip K, Mohan A. Antimicrobial photodynamic therapy: An overview. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2011;15(4): 323. DOI: <https://doi.org/10.4103/0972-124X.92563>
 22. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25(2):134-44. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1998.tb02419.x>