

**Пантьо Валерій Валерійович,**  
кандидат біологічних наук, доцент,  
доцент кафедри мікробіології, вірусології,  
епідеміології з курсами інфекційних хвороб та фтизіатрії,  
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

**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 курсами інфекційних хвороб та фтизіатрії  
ДВНЗ «Ужгородський національний університет»  
ORCID ID: 0000-0003-4391-2950  
м. Ужгород, Україна

## **Протимікробна дія низькоінтенсивного лазерного випромінювання та метиленового синього на деякі умовно-патогенні мікроорганізми**

Надмірне та неправильне використання антибіотиків призвело до появи та масового поширення стійких мікроорганізмів. Внаслідок цього актуальним є дослідження антимікробних властивостей немедикаментозних засобів, зокрема фотодинамічної терапії. **Метою роботи** було дослідження протимікробної активності комплексного впливу фотосенсибілізатора метиленового синього та низькоінтенсивного лазерного випромінювання червоного спектру щодо деяких умовно-патогенних мікроорганізмів.

Для вивчення комплексного впливу метиленового синього та лазерного випромінювання з довжиною хвилі 660 нм, досліджувані мікроорганізми були поділені на 4 групи: контрольна група; 2 група на яку діяли лише лазерним випромінюванням; 3 група – до якої додавали фотосенсибілізатор та 4 група, до якої додавали фотосенсибілізатор з подальшим опроміненням. Ступінь впливу вказаних факторів визначали шляхом підрахунку кількості мікробних колоній після пересіву на щільні поживні середовища у чашки Петрі.

Об'єкти дослідження – ізоляти *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* та *Candida albicans*, виділені із пародонтальних кишень хворих на хронічний генералізований пародонтит.

Встановлено, що низькоінтенсивне лазерне випромінювання володіє певним стимулюючим ефектом на досліджувану мікрофлору, що проявлялося у підвищенні інтенсивності росту мікроорганізмів на 10-37 %, порівняно з контролем. Кількість колоній мікроорганізмів 3 групи знижувалася в середньому на 10-54 %. Найбільш виражений протимікробний вплив відзначали при комплексному використанні метиленового синього та лазерного випромінювання. При цьому інтенсивність росту мікроорганізмів знижувалася на 26–77 %.

Таким чином, низькоінтенсивне лазерне випромінювання у комплексі з метиленовим синім володіють вираженою протимікробною активністю щодо досліджених штамів мікроорганізмів. Найбільшу антимікробну дію відзначали щодо *C. albicans*. Отримані результати можуть бути використані при лікуванні хвороб тканин пародонту, зокрема санації пародонтальних кишень.

**Ключові слова:** низькоінтенсивне лазерне випромінювання, антимікробна фотодинамічна терапія, умовно-патогенні мікроорганізми, резистентність, пародонтит.

**Pantyo Valeriy Valeriiovych**, candidate of biological sciences, associate professor, associate professor at the department of microbiology, virology, epidemiology with the courses of infectious diseases and phthisiatry, 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

**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 courses of infectious diseases and phthisiatry, Uzhhorod National University, ORCID ID: 0000-0003-4391-2950, Uzhhorod, Ukraine

## Antimicrobial action of low-intensity laser radiation and methylene blue on some opportunistic microorganisms

Overuse and misuse of antibiotics has led to the emergence and massive spread of resistant microorganisms. As a result, the study of antimicrobial properties of non-medicinal agents, in particular photodynamic therapy, is relevant. **The aim of the work** was to study the antimicrobial activity of the complex effect of the photosensitizer methylene blue and low-intensity laser radiation of the red spectrum on some opportunistic microorganisms.

To study the complex effect of methylene blue and laser radiation with a wavelength of 660 nm, the studied microorganisms were divided into 4 groups: control group; 2nd group that was treated only with laser radiation; group 3 – to which photosensitizer was added and group 4 to which photosensitizer was added with subsequent irradiation. The degree of influence of these factors was determined by counting the number of microbial colonies after inoculation into solid nutrient media in Petri dishes.

The objects of the study are strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* isolated from the periodontal pockets of patients with chronic generalized periodontitis.

It was established that low-intensity laser radiation has a certain stimulating effect on the studied objects, which was manifested in an increase in the intensity of the growth of microorganisms by 10-37%, compared to the control. The number of colonies of group 3 microorganisms decreased on average by 10-54%. The most pronounced antimicrobial effect was observed with the combined use of methylene blue and laser radiation. In this case the intensity of growth of microorganisms decreased by 26-77%.

Thus, low-intensity laser radiation in combination with methylene blue has pronounced antimicrobial activity against the studied strains of microorganisms. The greatest antimicrobial activity was noted against *C. albicans*. The obtained results can be used in the treatment of diseases of periodontal tissues, in particular, the rehabilitation of periodontal pockets.

**Key words:** low-intensity laser radiation, antimicrobial photodynamic therapy, opportunistic microorganisms, resistance, periodontitis.

**Вступ.** Антибіотики є невід'ємною частиною лікарських засобів, які використовуються для забезпечення здоров'я людей і тварин. Однак занадто широке, неправильне та надмірне їх використання зумовило появу та розвиток резистентних бактерій [2, 4]. Стійкість до антимікробних препаратів загрожує ефективній профілактиці та лікуванню постійно зростаючого спектру інфекцій, спричинених бактеріями, паразитами, вірусами та грибами [2, 4, 9].

Внаслідок цього використання немедикаментозних засобів для боротьби з інфекційними агентами та дослідження їх протимікробної активності набуває важливого значення.

Фотодинамічна терапія – новітній та малоінвазивний вид терапії, який використовується у лікуванні як онкогенних, так і не онкогенних захворювань [8]. Антимікробна фотодинамічна терапія полягає у використанні низькоінтенсивного випромінювання та фотосенсибілізатора, який при опроміненні переходить у збуджений стан, а при поверненні до нормального стану виділяє енергію. Акцепторами цієї енергії, як правило виступають молекули кисню, що в свою чергу призводить до утворення різноманітних кисневих радикалів та знищення мікробних клітин [3, 8].

Перевагами антимікробної фотодинамічної терапії є висока активність щодо широкого кола мікроорганізмів, неможливість останніми набуття стійкості, відсутність побічних ефектів, мала інвазивність тощо [1, 3, 8].

Питанням протимікробної активності фотодинамічної терапії присвячено чимало публікацій [1, 3, 7, 8, 10],

проте додаткової уваги, на нашу думку, потребує вивчення комплексного впливу різних видів низькоінтенсивного випромінювання та фотосенсибілізаторів на інтенсивність росту умовно-патогенних мікроорганізмів, що в свою чергу може привідкрити завісу в питанні механізму впливу світла низької інтенсивності на біологічні об'єкти.

**Мета роботи** – дослідити протимікробну активність комплексного впливу фотосенсибілізатора метиленового синього та низькоінтенсивного лазерного випромінювання червоного спектру щодо деяких умовно-патогенних мікроорганізмів.

**Методологія та методи дослідження.** Досліджено протимікробну активність комплексного застосування низькоінтенсивного лазерного випромінювання (НІЛВ) червоного спектру та метиленового синього на інтенсивність росту клінічних ізолятів *S. aureus*, *E. coli* та *C. albicans*, виділених з пародонтальних кишень хворих на хронічний генералізований пародонтит.

Ідентифікацію виділеної мікрофлори проводили за загальноприйнятими методами з використанням бактеріоскопічних та бактеріологічних методів. Для остаточної ідентифікації використовували тест-системи STAPHYtest 16, ENTEROtest 24 та CANDIDAtest 21 (Erba Lachema).

Для дослідження комплексного впливу НІЛВ та метиленового синього (0,1 % водний розчин) мікроорганізми було поділено на 4 групи. Першу групу – контрольну – після стандартизації (доводили до оптичної густини 0,5

за Мак-Фарландом та розводили у  $1,25 \times 10^5$  разів) пересівали на щільні поживні середовища (МПА) у чашки Петрі. Стандартизовані культури другої групи опромінювали НЛІВ з тривалістю експозиції 10 хв, після чого пересівали на чашки Петрі. До суспензії мікроорганізмів 3 групи додавали фотосенсибілізатор метиленовий синій у співвідношенні 10:1 (до 1 мл мікробного інокулюму додавали 0,1 мл метиленового синього), витримували в темряві протягом 10 хв та пересівали на чашки Петрі. У стандартизованій інокулюму мікроорганізмів 4 групи вносили метиленовий синій (у аналогічній до 3 групи пропорції), витримували у темряві 10 хв та опромінювали НЛІВ з тривалістю експозиції 10 хв (аналогічно 2 групі), після чого пересівали на чашки Петрі з МПА. Інтенсивність росту мікроорганізмів оцінювали шляхом підрахунку кількості мікробних колоній на чашках Петрі після 24 год (24-48 год для *C. albicans*) культивування у термостаті при 37 °С. Для всіх досліджуваних груп об'єм інокулюму, який пересівали на чашки Петрі становив 0,1 мл. Усі дослідження виконувались у 5-кратній повторюваності.

Джерела лазерного випромінювання – лазери «ЛІКА-терапевт» та лазерний скануючий двоканальний апарат «Медик 2К» виробництва підприємства «Фотоніка плюс» м. Черкаси. Довжина хвилі червоного спектру становить 660 нм, використовували щільність потужності 50 мВт/см<sup>2</sup> при безперервному режимі.

Опромінення мікробного інокулюму НЛІВ лазера «ЛІКА-терапевт» проводили у мікропробірці типу емпендорф (рис. 1а). Опромінення НЛІВ лазера «Медик 2К» проводили у чашках Петрі діаметром 50 мм з відстані 50 см, фігура сканування – «коло, яке збігається в точку» (рис. 1б). У обох випадках об'єм інокулюму становив 1 мл.

У зв'язку з суперечливістю літературних даних щодо спектру поглинання випромінювання метиленовим синім, проведено визначення його абсорбційних піків у видимому та ближньому інфрачервоному діапазонах. Для цього реєстрували спектри в діапазоні від 200 нм до 1000 нм за допомогою кварцових кювет оптичної якості та спектрофотометра InSpect.

Отримані дані статистично обробляли з визначенням середнього арифметичного вибірки та стандартного відхилення з використанням програми Statistica 10.0.

**Виклад основного матеріалу дослідження.** Встановлено, що НЛІВ, фотосенсибілізатор метиленовий синій, а також комплексне використання фотосенсибілізатора та НЛІВ суттєво впливає на інтенсивність росту досліджуваних штамів. Ступінь впливу відрізнявся у різних мікроорганізмів та був більш виражений для грампозитивних мікроорганізмів – *S. aureus* та *C. albicans*. Пік поглинання метиленового синього склав 664 нм, що відповідає червоному діапазону спектра. Кількісні дані росту мікроорганізмів на щільних поживних середовищах при використанні скануючого лазера представлені в таблиці 1 (вказані середнє арифметичне та стандартне відхилення вибірок).

Опромінення НЛІВ мікроорганізмів другої групи зумовлювало підвищення інтенсивності їх росту в середньому на 14–37 %, порівняно з контролем. Додавання фотосенсибілізатора до суспензії мікроорганізмів 3 групи знижувало кількість колоній на поживних середовищах на 10–54 %, порівняно з мікроорганізмами 1 групи. Комплексний вплив 0,1 % водного розчину метиленового синього та НЛІВ зумовлював зниження інтенсивності росту досліджуваних мікроорганізмів на 45–77 %.

Кількісні дані щодо інтенсивності росту мікроорганізмів при використанні лазера «ЛІКА-терапевт» представлено в табл. 2.

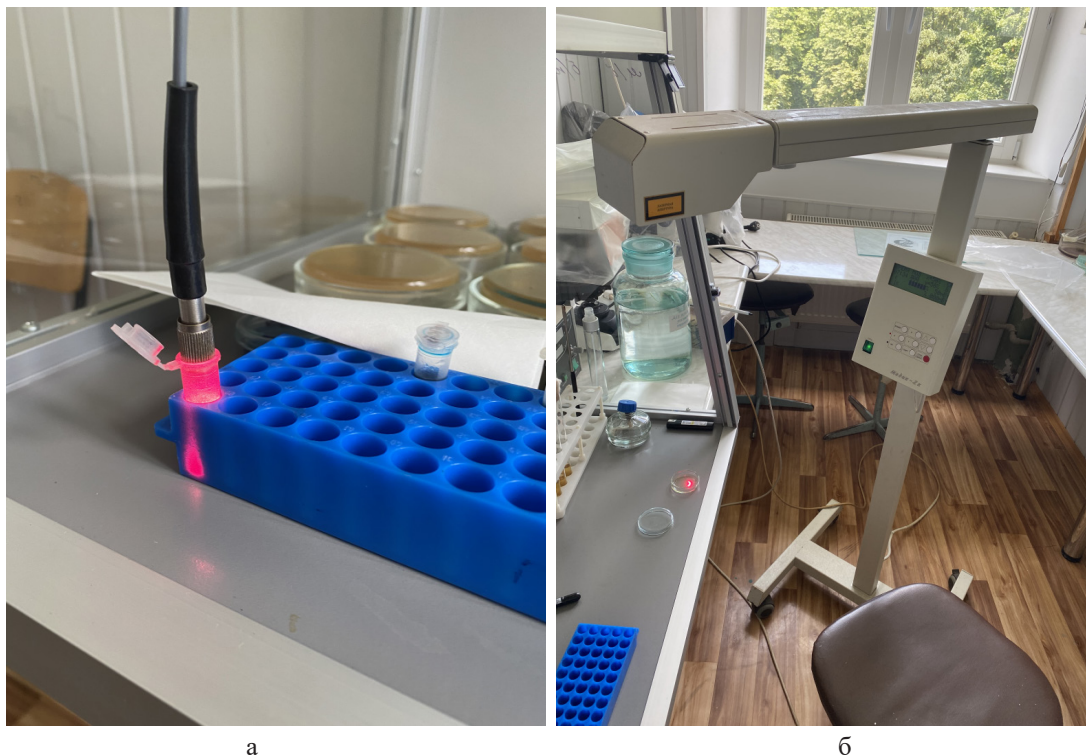


Рис. 1. Опромінення мікробного інокулюму низькоінтенсивним лазерним випромінюванням лазерів «ЛІКА-терапевт» (а) та «Медик 2К» (б)

Таблиця 1

## Кількість бактеріальних колоній на чашках Петрі при використанні лазера «Медик 2К»

Вид мікроорганізмів	1 група (контроль) (n=5)	2 група (опромінений інокулюм) (n=5)	3 група (інокулюм + МС) (n=5)	4 група (інокулюм + МС + опромінення (n=5)
<i>Staphylococcus aureus</i>	90±14	103±19	71±10	37±9
<i>Escherichia coli</i>	104±11	120±17	94±16	57±9
<i>Candida albicans</i>	103±12	141±13	48±6	24±5

Таблиця 2

## Кількість бактеріальних колоній на чашках Петрі при використанні лазера «ЛІКА-терапевт»

Вид мікроорганізмів	1 група (контроль)	2 група (опромінений інокулюм)	3 група (інокулюм + МС)	4 група (інокулюм + МС + опромінення
<i>Staphylococcus aureus</i>	87±11	99±10	68±7	58±6
<i>Escherichia coli</i>	101±10	111±12	83±7	75±5
<i>Candida albicans</i>	93±17	112±17	48±8	39±7

Опромінення досліджуваних штамів НІЛВ лазера «ЛІКА-терапевт» підвищувало інтенсивність їх росту на щільних середовищах на 10–20 %, порівняно з контрольною групою. Кількість колоній мікроорганізмів 3 групи знижувалася в середньому на 18–48 % у порівнянні з 1 групою. Інтенсивність росту мікроорганізмів 4 групи знижувалася на 26–58 %.

Як у випадку використання скануючого лазерного випромінювання апарату «Медик 2К», так і лазерного випромінювання апарату «ЛІКА-терапевт», спостерігали стимулюючий вплив на досліджувані штами мікроорганізмів, що проявлялося у підвищенні інтенсивності росту опромінених культур, порівняно з контролем. Дещо більшим стимулюючим ефектом володіло скануюче випромінювання. 0,1 % водний розчин метиленового синього проявляв протимікробний ефект щодо мікроорганізмів та знижував кількість мікробних колоній на 10–54 %. Найбільш суттєвий вплив відзначали по відношенню до *C. albicans*. Комплексне використання фотосенсибілізатора метиленового синього та НІЛВ зумовлювало зниження інтенсивності росту мікроорганізмів на 26–77 %. Як і у випадку окремого застосування фотосенсибілізатора, найбільш виражений протимікробний ефект спостерігали щодо досліджуваного ізоляту *C. albicans*. Слід також відзначити

значно більш виражений протимікробний ефект при використанні скануючого НІЛВ в комплексі з метиленовим синім, порівняно з аналогічним використанням НІЛВ, яке генерує апарат «ЛІКА-терапевт».

Аналізуючи результати попередніх досліджень з використанням інших джерел низькоінтенсивного випромінювання [5, 6], а також дані інших авторів [1, 7, 10], можна констатувати, що основними фізичними якістьми світла, які зумовлюють біологічну дію на мікроорганізми є довжина хвилі та щільність потужності. Разом з тим такі властивості, як когерентність та поляризованість, не володіють визначальним впливом на біологічні властивості мікроорганізмів.

**Висновки з дослідження.** Низькоінтенсивне лазерне випромінювання у комплексі з метиленовим синім володіють вираженою протимікробною активністю щодо досліджених штамів *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* та *Candida albicans*. Ступінь антимікробної дії при використанні сукупності вказаних факторів суттєво перевищує їх активність у разі окремого впливу на мікроорганізми. Більш чутливими до комплексу фотосенсибілізатор та низькоінтенсивне лазерне випромінювання були грам-позитивні мікроорганізми. Отримані результати можуть бути використані при лікуванні хвороб тканин пародонту, зокрема санації пародонтальних кишень.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Abrahamse H, Hamblin M.R. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal*. 2016; Vol. 473(4). P. 347-364.
2. Антибіотикорезистентність мікроорганізмів: механізми розвитку й шляхи запобігання / Бондар М.В., Пилипенко М.М., Свінтуковський М.Ю., Харченко Л.А., Превисла О.М., Цвик І.М. Медицина невідкладних станів. 2016. 74(3). С. 11–17.
3. Antimicrobial photodynamic therapy: An overview / Rajesh S., Koshi E., Philip K., Mohan A. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2011. 15(4). P. 323.
4. Dugassa, J. and Shukuri, N. Review on antibiotic resistance and its mechanism of development. *Journal of Health, Medicine and Nursing*. 2017. Vol 1 (3). P 1-17.
5. Complex impact of polarized and non-polarized low intense light and methylene blue on growth rate of some opportunistic microorganisms / Pantyo V.V., Koval G.M., Danko E.M., Pantyo V.I. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2020. Vol. 11(4). P. 520-523.
6. Impact of polarized low-intense radiation and photosensitizers on growth of *Staphylococcus aureus* / Pantyo V. V., Danko E. M., Fizer M. M., Koval G. M., Pantyo V. I. *Bulletin of problems biology and medicine*. 2022. Issue 2 Part 2 (165). P. 12-16.

7. In vitro effect photodynamic therapy with different photosensitizers on cariogenic microorganisms / Soria-Lozano P, Gilaberte Y, Paz-Cristobal MP, Pérez-Artiaga L, Lampaya-Pérez V, Aporta J, et al. *BMC microbiology*. 2015. Vol 15(1). P. 1-8.
8. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations / Kwiatkowski S., Knap B., Przystupski D., Saczko, J., Kędzierska E., Knap-Czop, K., & Kulbacka, J. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018. Vol 106. P. 1098-1107
9. Свіжак В.К.; Дейнека С.Є. Антибіотикорезистентність: багатогранність проблеми. *Клінічна та експериментальна патологія*. 2014. 13(2). С. 222-224
10. The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers / Rolim J. P., De-Melo M. A., Guedes S. F., Albuquerque-Filho F. B., De Souza J. R., Nogueira N. A., Zanin C. J., & Rodrigues, L. K. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2012. 106. P. 40-46

#### REFERENCES

1. Abrahamse H, Hamblin MR. (2016) New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal*, 473(4), 347-364 [in English]. DOI: 10.1042/BJ2015 0942
2. Bondar, M., Pylypenko, M., Svintukovskyi, M., Kharchenko, L., Prevysla, O., & Tsvyk, I. (2022). Antibiotic Resistance: Mechanisms of Development and Ways to Prevent. *EMERGENCY MEDICINE*, 74(3), 11–17 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.22141/2224-0586.3.74.2016.76136>
3. Rajesh, S., Koshi, E., Philip, K., & Mohan, A. (2011). Antimicrobial photodynamic therapy: An overview. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 15(4), 323 [in English].
4. Dugassa, J. and Shukuri, N. (2017) Review on antibiotic resistance and its mechanism of development. *Journal of Health, Medicine and Nursing*, 1 (3), 1–17 [in English].
5. Pantyo V.V., Koval G.M., Danko E.M., Pantyo V.I. (2020) Complex impact of polarized and non-polarized low intense light and methylene blue on growth rate of some opportunistic microorganisms. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 11(4), 520-523 [in English]. DOI: <https://doi.org/10.15421/022079>
6. Pantyo V. V., Danko E. M., Fizer M. M., Koval G. M., Pantyo V.I. (2022) Impact of polarized low-intense radiation and photosensitizers on growth of *Staphylococcus aureus*. *Bulletin of problems biology and medicine*, 2(165), 12-16 [in English]. DOI: 10.29254/2077-4214-2022-2-2-165-12-16
7. Soria-Lozano P, Gilaberte Y, Paz-Cristobal MP, Pérez-Artiaga L, Lampaya-Pérez V, Aporta J, et al. (2015) In vitro effect photodynamic therapy with different photosensitizers on cariogenic microorganisms. *BMC microbiology*, 15(1), 1-8 [in English]. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0524-3>
8. Kwiatkowski S., Knap B., Przystupski D., Saczko, J., Kędzierska E., Knap-Czop, K., & Kulbacka, J. (2018). Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 1098-1107 [in English]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.049>
9. Svizhak V. K., Deyneka S. E. (2014) Antibiotic resistance: many-sided nature of problem. *Clinical & Experimental Pathology*, 13(2), 222-224 [in Ukrainian].
10. Rolim J. P., De-Melo M. A., Guedes S. F., Albuquerque-Filho F. B., De Souza J. R., Nogueira N. A., Zanin C. J., & Rodrigues, L. K. (2012) The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 106, 40-46 [in English]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.10.001>